



**Elisabete Sofia Cruz  
Correia**

**Avaliação do potencial imunoestimulador de  
polissacarídeos da levedura**





**Elisabete Sofia Cruz  
Correia**

**Avaliação do potencial imunoestimulador de  
polissacarídeos da levedura**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica Ramo Clínico, realizada sob a orientação científica do Doutor Manuel António Coimbra, Professor associado com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e da Doutora Elisabete Coelho, bolseira de Pós-Doutoramento do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.



Dedico este trabalho aos meus pais e irmão pela infinita paciência.



## O júri

Presidente	Professora Doutora Maria do Rosário Gonçalves dos Reis Marques Domingues Professora auxiliar com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro
Orientador	Professor Doutor Manuel António Coimbra Rodrigues da Silva Professor associado com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro
Arguente	Professor Doutor Manuel João Rua Vilanova Professor associado no Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto





## Agradecimentos

Agradeço aos meus orientadores Professor Doutor Manuel António Coimbra e Doutora Elisabete Coelho pelo conhecimento transmitido ao longo do meu percurso académico, disponibilidade, paciência e motivação.

À Unicer Bebidas, SA, pela levedura cervejeira *S. pastorianus* fornecida.

Agradeço ao ICBAS e ao Professor Vilanova pela disponibilidade do laboratório de imunologia no ICBAS. Agradeço em particular ao Pedro Madureira pela ajuda concedida na realização da citometria de fluxo. Ao Doutor Dmitry pela disponibilidade e ajuda com as análises de GPC. Ao Ricardo Pinto pelas análises de microscopia eletrónica.

Ao QOPNA pela disponibilização do equipamento laboratorial necessário para a realização deste trabalho e a todos os colegas de laboratório com quem tive o prazer de me cruzar. Um especial agradecimento à Rita Bastos pela ajuda, paciência, conversas e lanches, à Lisete Silva pela preciosa ajuda com a coluna de cromatografia, à Élia Maricato e Angélica Rocha pelas dicas e apoio e ao Mauro, sempre disponível para me ajudar com a leitura de placas.

Agradeço muito a todos os amigos que tive o prazer de ganhar durante este percurso, à Andrea, à Susana, à Patrícia, à Catarina e à Catita, que a amizade se mantenha.

Agradeço sobretudo à minha família. Aos meus pais, irmão e cunhada por serem os meus melhores amigos, por acreditarem em mim e me apoiarem nas minhas escolhas. Às minhas primas e primos pelas brincadeiras, risadas e momentos tão bem passados, em especial à Paula pelas conversas prolongadas quando a vontade de estudar tardava em chegar.

Um muito obrigada a todos!



## palavras-chave

*Saccharomyces cerevisiae*, levedura excedentária, parede celular, imunoestimulação, extração assistida por micro-ondas.

## resumo

Na indústria das bebidas fermentadas, nomeadamente da cerveja, são usadas leveduras do género *Saccharomyces*, que são descartadas após alguns ciclos de fermentação. A parede celular das leveduras é composta por manoproteínas, glucanas ( $\beta 1 \rightarrow 3$ ) e ( $\beta 1 \rightarrow 6$ ), glicogénio e quitina, sendo que recentemente também foi descrita a presença de glucanas ( $\beta 1 \rightarrow 4$ ), polímeros semelhantes à celulose. As manoproteínas e as glucanas ( $\beta 1 \rightarrow 3$ ) são descritas por apresentarem propriedades imunoestimuladoras e antitumorais, sendo reconhecidas por recetores específicos que induzem respostas inflamatórias, sendo classificadas como *Biological Response Modifiers*. Atendendo à quantidade elevada deste subproduto da indústria cervejeira, o objetivo desta dissertação foi desenvolver metodologias de extração utilizando micro-ondas que permitissem obter glucanas e manoproteínas com possível atividade imunoestimuladora.

Neste trabalho foi feita a extração de polissacarídeos da parede celular da levedura cervejeira, após autólise, recorrendo a extração aquosa sequencial assistida por micro-ondas. O potencial efeito imunoestimulador dos polissacarídeos extraídos foi estudado *in vitro* utilizando esplenócitos de murganhos. Foram efetuados quatro ciclos extrativos à mesma levedura excedentária, os dois primeiros a 180°C, a que se seguiram dois ciclos a 200°C, sempre utilizando uma razão sólido/água de 1:28 (m/m). Verificou-se que a primeira extração permite obter um extrato rico em manose (75% do total de carbo-hidratos no extrato), na segunda extração o extrato tinha quantidades equimolares de manose e glucose e no terceiro e quarto extratos a glucose representa 80 e 70%, respetivamente do total de carbo-hidratos presentes em cada extrato. A manose presente nos extratos encontrava-se maioritariamente em ligações (1 $\rightarrow$ 2) e (1 $\rightarrow$ 2,6), características das manoproteínas da levedura. A identificação de resíduos de glucose em ligação (1 $\rightarrow$ 4) e (1 $\rightarrow$ 4,6) permite inferir a presença de glicogénio das paredes celulares da levedura. No quarto ciclo foram identificados 32% de resíduos de glucose em ligação (1 $\rightarrow$ 3) juntamente com 34% de resíduos de glucose em ligação (1 $\rightarrow$ 4).

Para identificar a configuração anomérica dos resíduos de glucose em ligação (1 $\rightarrow$ 4), foi efetuada uma hidrólise enzimática com  $\alpha$ -amilase e celulase ao material proveniente da quarta extração com micro-ondas. O tratamento com  $\alpha$ -amilase permitiu verificar a diminuição de massa do extrato após diálise e o enriquecimento em resíduos (1 $\rightarrow$ 3)-Glc, confirmando a presença de glicogénio. O tratamento com celulase permitiu verificar a perda de massa após diálise e a diminuição da percentagem de ligações (1 $\rightarrow$ 4), o que confirma a presença de glucose em ligação ( $\beta 1 \rightarrow 4$ ). No entanto, não se verificou um enriquecimento em (1 $\rightarrow$ 3)-Glc, o que poderá indicar a presença no mesmo polissacarídeo de ligações (1 $\rightarrow$ 3) e (1 $\rightarrow$ 4) que, após tratamento com celulase, difundiram pela membrana de diálise. Estes ensaios permitiram também estimar que a conformação da glucose em ligação (1 $\rightarrow$ 4) é maioritariamente  $\alpha$ . O primeiro e quarto extratos foram submetidos a um fracionamento por cromatografia de exclusão molecular em Sephacryl S200, tendo-se recolhido 3 frações de cada extrato com diferentes massas moleculares e composição em ligações glicosídicas. Estas frações, juntamente com os quatro extratos obtidos inicialmente e o 4º extrato obtido após hidrólise com  $\alpha$ -amilase foram estudados quanto ao seu potencial imunoestimulador de linfócitos B e T. As amostras ricas em manoproteínas, nomeadamente as 3 frações obtidas por cromatografia de exclusão molecular do 1º extrato ativaram os linfócitos B, com um máximo de ativação celular de 61% para 25 e 50  $\mu$ g/mL com a primeira e terceira frações, respetivamente, e com 40% para a segunda fração (25-75  $\mu$ g/mL). Este trabalho permitiu concluir que é possível extrair com micro-ondas manoproteínas da levedura excedentária de cerveja com potencial atividade imunoestimuladora.



## keywords

*Saccharomyces cerevisiae*, brewers' spent yeast, mannoproteins, glucans, immunostimulation, microwave assisted extraction.

## abstract

The genus *Saccharomyces* are the yeast used in breweries, which are discarded after a few cycles of fermentation. Yeast cell wall is composed of mannoprotein, glucan ( $\beta 1 \rightarrow 3$ ), ( $\beta 1 \rightarrow 6$ ), glycogen, and chitin. Recently, it was described the presence of ( $\beta 1 \rightarrow 4$ ) linked glucose linkages, resembling these polymers cellulose. Mannoproteins and glucans ( $\beta 1 \rightarrow 3$ ) are described as having immunostimulatory and antitumor properties and are recognized by specific receptors that induce inflammatory responses, are classified as Biological Response Modifiers. Attending to the high quantities of this by-product from brewery industry, the aim of this dissertation was to develop microwave extraction methodologies that would allow to obtain glucans and mannoproteins with potential immunostimulatory activity.

In this work, the extraction of cell wall polysaccharides from brewers spent yeast was performed using microwave assisted aqueous sequential extraction. The extracted polysaccharides potential immunostimulatory activity was studied *in vitro* using BALB/c mice splenocytes. Four extraction cycles were performed to the brewers spent yeast, the first two at 180°C, followed by two cycles at 200°C using a solid/water ratio of 1:28 (w/w). In the first extraction a mannose rich extract was obtained, having 75% of the total carbohydrates. In the second extraction, an equimolar amount of mannose and glucose was obtained, and in the third and fourth extracts, glucose represented 80 and 70%, respectively, of the total carbohydrates of each extract. Mannose present in the extracts occurred mainly as (1 $\rightarrow$ 2)-Man and (1 $\rightarrow$ 2,6)-Man, which are characteristic of yeast cell walls. The presence of (1 $\rightarrow$ 4) and (1 $\rightarrow$ 4,6) linked glucose residues allowed to infer the presence of glycogen. The fourth cycle was composed of 32% of (1 $\rightarrow$ 3)-Glc and 34 % of (1 $\rightarrow$ 4)-Glc residues.

To identify the anomeric conformation of the (1 $\rightarrow$ 4)-Glc residues, an enzymatic hydrolysis was done with  $\alpha$ -amylase and cellulase to the material from the last extraction cycle. The treatment with  $\alpha$ -amylase allowed to observe a mass decrease of the extract after dialysis and an enrichment in (1 $\rightarrow$ 3)-Glc residues, confirming the presence of glycogen. Cellulase treatment allowed to observe a mass decrease of the extract after dialysis and also a decrease of (1 $\rightarrow$ 4)-Glc linkages, confirming the presence of glucose in ( $\beta 1 \rightarrow 4$ ) linkages. However, it was not observed an enrichment in (1 $\rightarrow$ 3)-Glc, which may indicate the presence of (1 $\rightarrow$ 3) and (1 $\rightarrow$ 4) linkages in the same polysaccharide, which should have diffused throughout the dialysis membrane after cellulase treatment. These trials allowed to estimate that the (1 $\rightarrow$ 4)-Glc linkages were mainly in  $\alpha$  anomeric conformation.

The first and fourth extracts were subjected to a fractionation by size exclusion chromatography using Sephacryl S200. Three fractions of each extract were collected, having different molecular weight and glycosidic linkage composition. These fractions, together with the 4 extracts obtained by microwave-assisted extraction, and the 4<sup>th</sup> extract hydrolysed with  $\alpha$ -amylase, were studied concerning their immunostimulatory potential activity towards lymphocytes B and T.

It was observed that the samples rich in mannoproteins, namely the three fractions obtained from size exclusion chromatography from the first extract activated lymphocytes B. The maximum cellular activation was 61% for 25 and 50  $\mu$ g/mL for the first and third fractions, respectively, and was 40% for the second fraction (25 e 75  $\mu$ g/mL). This work allowed to conclude that using microwave assisted extraction it is possible to extract mannoproteins from brewers spent yeast with potential immunostimulatory activity.



## Índice Geral

Índice Geral .....	i
Índice de Figuras.....	iii
Índice de tabelas .....	v
Lista de abreviaturas .....	vi
1. Considerações teóricas .....	1
1.1 Introdução .....	1
1.2 Levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	1
1.2.1 Parede celular da levedura.....	2
1.3 Polissacarídeos da parede celular da levedura.....	4
1.3.1 Glucanas .....	4
1.3.2 Manoproteínas .....	7
1.4 Efeitos biológicos.....	9
1.4.1 Efeito Imunoestimulador .....	9
1.4.2 Efeito Antitumoral .....	14
1.4.3 Efeito antibacteriano .....	15
1.4.4 Controlo do colesterol.....	15
1.4.5 Atividade cicatrizante.....	16
1.5 Relação atividade-estrutura .....	16
1.6 Extração de polissacarídeos da parede celular de levedura cervejeira.....	18
1.7 Âmbito do trabalho .....	19
2. Material e métodos.....	21
2.1 Amostra .....	23
2.2 Isolamento das paredes celulares da amostra .....	23
2.2.1 Autólise térmica .....	23
2.2.2 Autólise por sonicação .....	23
2.3 Microscopia ótica.....	24
2.4 Microscopia eletrónica de varrimento.....	24
2.5 Determinação do teor de humidade e de sólidos totais .....	24
2.6 Extração sequencial dos polissacarídeos da parede celular da levedura excedentária...25	
2.7 Análise de açúcares .....	28
2.7.1 Análise de açúcares neutros.....	28

2.7.2 Determinação de ácidos urónicos .....	29
2.7.3 Análise colorimétrica de açúcares totais .....	30
2.8 Análise de ligações glicosídicas por metilação.....	30
2.9 Cromatografia de Exclusão Molecular (SEC) .....	31
2.9.1 Cromatografia de Exclusão Molecular Analítica.....	31
2.9.2 Cromatografia de Exclusão Molecular Preparativa .....	32
2.10 Determinação de proteína .....	33
2.10.1 Proteína total.....	33
2.10.2 Proteína solúvel.....	33
2.11 Determinação de aminoácidos .....	33
2.12 Hidrólises enzimáticas.....	34
2.12.1 $\alpha$ -amilase .....	35
2.12.2 Celulase .....	35
2.13 Determinação da presença da conformação em tripla hélice.....	35
2.14 Ensaio de imunoestimulação .....	36
2.14.1 Obtenção dos esplenócitos .....	36
2.14.2 Incubação de células com amostra.....	37
2.14.3 Incubação de células com CLI.....	37
2.14.4 Marcação celular .....	38
3. Resultados e discussão .....	39
3.1 Processo de autólise .....	41
3.2 Extração sequencial assistida por micro-ondas .....	43
3.2.1 Análise de ligações glicosídicas .....	45
3.2.2 Determinação da presença da conformação em tripla hélice .....	48
3.2.3 Hidrólise enzimática com celulase e $\alpha$ -amilase .....	49
3.2.4 Cromatografia de Permeação em Gel (SEC).....	50
3.2.4.1 Análise das ligações glicosídicas das frações do Et80.4.....	55
3.3 Determinação de proteína e aminoácidos.....	56
3.4 Ensaio de imunoestimulação .....	58
4. Conclusões e trabalho futuro.....	65
5. Bibliografia.....	71



## Índice de Figuras

Figura 1 - Representação gráfica da composição da parede celular da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (adaptado de (18)).....	3
Figura 2 - Representação das ligações glicosídicas do glicogénio (adaptado de (22)).....	5
Figura 3 - Pontes de hidrogénio estabelecidas entre as cadeias de glucanas ( $\beta 1 \rightarrow 3$ ) ao longo da estrutura helicoidal tripla (adaptado de (25)).....	6
Figura 4 - Modelo da cadeia de glucanas ( $\beta 1 \rightarrow 6$ ) da parede celular da <i>S. cerevisiae</i> . Os círculos brancos correspondem a unidades de glucose em ligações $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6); os círculos pretos correspondem a unidades de glucose $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3, 6); os círculos cinzentos correspondem a unidades de glucose ( $\beta 1 \rightarrow 3$ ) laterais (adaptado de (27)). .....	6
Figura 5 - Estrutura da manoproteínas em ligação do tipo <i>N</i> e <i>O</i> da <i>S. cerevisiae</i> (27). .....	8
Figura 6 - Células imunoestimuladas pelas $\beta$ -glucanas fúngicas e respetiva resposta resultante (adaptado de (37)). .....	12
Figura 7 - Componentes fúngicos reconhecidos pelos recetores presentes nas células que levam à sua ativação. (Adaptado de (50) .....	18
Figura 8 - Representação esquemática da extração sequencial dos polissacarídeos da levedura cervejeira excedária. ....	27
Figura 9 - Observações microscópicas da levedura com ampliação de 400X corada com Trypan Blue. Em A observa-se a levedura antes de sofrer qualquer processo de autólise. Em B e C observa-se a levedura após o processo de autólise térmica e sonicação.....	41
Figura 10 - Observações microscópicas em microscopia eletrónica de varrimento dos resíduos obtidos após extração assistida por micro-ondas. ....	45
Figura 11 - Valores de absorvância máximos da solução de Congo Red e da solução de Congo Red com a amostra na presença de diferentes concentrações alcalinas.....	48
Figura 12 - Cromatogramas obtidos durante a análise dos extratos resultantes da extração em MW. O cromatograma identificado como 1 corresponde ao extrato Et80.1, o 2 ao Et80.2, o 3 ao Et80.3 e o 4 ao Et80.4. Os picos identificados I, II, III e IV correspondem às frações identificadas.....	51
Figura 13 - Cromatograma referente ao extrato Et80.1. $V_0$ e $V_i$ correspondem ao volume de exclusão e inclusão, respetivamente. ....	54
Figura 14 - Cromatograma referente ao extrato Et80.1. $V_0$ e $V_i$ correspondem ao volume de exclusão e inclusão, respetivamente. ....	54

Figura 15 - Percentagem de ativação das células B perante o estímulo do extrato Et80.1 a 50 e 25 µg/mL e das respetivas frações obtidas por exclusão molecular.....	59
Figura 16 - Citogramas correspondentes aos controlos negativo, RPMI, e positivo, LPS, de ativação de células B.....	60
Figura 17 - Percentagem de ativação das células B perante o estímulo com as diferentes amostras a diferentes concentrações: 12,5; 25; 50 e 75 µg/mL.....	61
Figura 18 - Percentagem de ativação das células B perante o estímulo das diferentes amostras a 50 µg/mL na ausência e na presença do inibidor CLI. ....	63

## Índice de tabelas

Tabela 1 - Polissacarídeos da parede celular da <i>S. cerevisiae</i> (10) .....	4
Tabela 2 - Locais de expressão dos PRRs associados a polissacarídeos BRM.....	11
Tabela 3 - Análise aos hidratos de carbono presentes no precipitado e sobrenadante resultantes dos processos de autólise térmica e por sonicação.....	42
Tabela 4 - Análise de açúcares neutros e rendimentos da extração sequencial assistida por MW. ....	43
Tabela 6 - Ligações glicosídicas dos extratos ricos em polissacarídeos (Et80) obtidos durante a extração sequencial assistida por MW, sendo expressa a média dos dois reatores. Entre parentesis estão os valor relativos à fração molar obtidos por análise de açúcares neutros por GC-FID. ....	46
Tabela 7 - Ligações glicosídicas presentes no extrato Et80.4 após tratamento com celulase e $\alpha$ -amilase.....	49
Tabela 8 - Peso molecular das diferentes frações identificadas em cada extrato.....	51
Tabela 9 - Aminoácidos presentes no precipitado da autólise, nos extratos de MW e no resíduo final. ....	57
Tabela 10 - Ligações glicosídicas das frações recolhidas por cromatografia de exclusão molecular da fração Et80.4.....	55

## Lista de abreviaturas

**% mol** – Percentagem molar  
**Ala** - Alanina  
**Ara** - Arabinose  
**Asx** – Ácido aspártico/Asparagina  
**AU** - Ácidos urónicos  
**BCA** - Ácido Bicinconínico  
**BHT** – Hidroxitolueno butilado  
**BRM** – Modificadores da resposta biológica  
**BSA** - Albumina de Soro Bovino  
**CRD** - Domínio extracelular de reconhecimento de hidratos de carbono  
**DMSO** – Dimetilsulfóxido  
**DNA** – Ácido desoxirribonucleico  
**dRib** - Desoxirribose  
**eNOS** – Óxido nítrico sintase endotelial  
**Et80.1** – Precipitado obtido após precipitação etanólica a 80 % do extrato obtido no primeiro ciclo  
**Et80.2** – Precipitado obtido após precipitação etanólica a 80 % do extrato obtido no segundo ciclo  
**Et80.3** – Precipitado obtido após precipitação etanólica a 80 % do extrato obtido no terceiro ciclo  
**Et80.4** – Precipitado obtido após precipitação etanólica a 80 % do extrato obtido no quarto ciclo  
**EtSn.1** - Sobrenadante obtido após precipitação etanólica a 80 % do extrato obtido no primeiro ciclo  
**EtSn.2** - Sobrenadante obtido após precipitação etanólica a 80 % do extrato obtido no segundo ciclo  
**EtSn.3** - Sobrenadante obtido após precipitação etanólica a 80 % do extrato obtido no terceiro ciclo  
**EtSn.4** - Sobrenadante obtido após precipitação etanólica a 80 % do extrato obtido no quarto ciclo  
**FACS** – Solução balanceada de sais suplementada com 10 mmol/L de azida de sódio em 1% de BSA  
**FBS** - Soro Bovino Fetal  
**GC-FID** - Cromatografia em fase gasosa com detetor de ionização em chama  
**GC-qMS** - Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa com quadrupolo  
**Glc** - Glucose  
**GlcNAc** – N-acetilglucosamina  
**Glx** – Ácido glutâmico/Glutamina  
**Gly** - Glicina  
**GPI** – Glicosil-fosfatidil-inositol  
**HEPES** – Ácido etanosulfónico 2-[4-(2-hidroxietilo)-1-piperazinilo]  
**iC3B** – Recetor de Fragmentos do Complemento 3  
**IL** - Interleucina  
**Ile** - Isoleucina  
**INF- $\alpha$**  - Interferão- $\alpha$   
**LacCer** - Lactosilceramida  
**LDL** – Lipoproteínas de Baixa Densidade  
**Leu** - Leucina  
**LPS** - Lipopolissacarídeo  
**Lys** - Lisina  
**Man** - Manose  
**MAPK** – Proteína Cinase Ativada por Mitogénio  
**MFF** - *m*-fenilfenol  
**MW** – Micro-ondas  
**NaOH** – Hidróxido de Sódio  
**NF- $\kappa$ B** - Nuclear Factor- $\kappa$ B  
**NK** – *Natural Killers*  
**PAMP** - Padrões Moleculares Associados a Patogénios  
**Pir** - Proteins with internal repeats  
**PMAA** - Acetatos de alditol parcialmente metilados  
**Pp** - Precipitado  
**Pp\_Aut** – Precipitado de Autólise  
**Pro** - Prolina

**PRR** – Recetor para Reconhecimento de Padrões  
**Rib** - Ribose  
**RM** - Recetores de Manose  
**RNA** – Ácido Ribonucleico  
**ROS** – Espécies Reativas de Oxigénio  
**rpm** – Rotações por minuto  
**RPMI** – Meio Roswell Park Memorial Institute  
**RS** - Recetores *Scavenger*  
**SEC** – Cromatografia de Exclusão Molecular  
**Ser** - Serina  
**Sn** - Sobrenadante  
**Sn\_MW.1** – Extrato obtido após o primeiro ciclo da extração assistida por micro-ondas  
**Sn\_MW.2** - Extrato obtido após o segundo ciclo da extração assistida por micro-ondas  
**Sn\_MW.3** - Extrato obtido após o terceiro ciclo da extração assistida por micro-ondas  
**Sn\_MW.4** - Extrato obtido após o quarto ciclo da extração assistida por micro-ondas  
**TFA** – Ácido trifluoroacético  
**Th** - Linfócitos T *helper*  
**Thr** - Triptofano  
**TLR** - Recetores *Toll-Like*  
**TNF- $\alpha$**  – Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$   
**TRIS-HCl** - Tris-hidroximetilaminometano em Ácido Clorídrico  
**Val** - Valina  
**Xyl** – Xilose  
 **$\eta$**  - Rendimento



## **1. Considerações teóricas**





## 1.1 Introdução

As leveduras desempenham um importante papel em diversos setores industriais pelo seu vasto potencial de utilização como ferramenta biotecnológica. As do género *Saccharomyces* são das leveduras mais estudadas, não só devido à sua ampla utilização nas indústrias de panificação, cervejeiras e vinícolas, como também por se tratar de um importante modelo de estudo na Biologia Celular. Ao serem utilizadas como agentes biológicos de transformação na indústria de bebidas fermentadas, resulta num excedente de biomassa rico em polissacarídeos com interesse bioativo (1, 2). Assim, torna-se interessante estudar a possibilidade de utilização do excedente de levedura para extração de polissacarídeos com efeitos biológicos benéficos.

Uma série de polissacarídeos têm vindo a demonstrar ter actividade imunomoduladora e, por isso, alguns deles são classificados como *Biological Response Modifiers* (BRM) (3).

## 1.2 Levedura *Saccharomyces cerevisiae*

As leveduras são microorganismos unicelulares, biologicamente classificados como fungos. São aeróbios facultativos (4). Esta capacidade é relevante para o processo de fabrico do pão e de bebidas fermentadas. Na indústria de bebidas fermentadas são utilizadas essencialmente leveduras do género *Saccharomyces*. As variedades de leveduras usadas no processo de fermentação da cerveja podem dividir-se em dois grupos: as leveduras de fermentação alta e as leveduras de fermentação baixa consoante a temperatura a que se dá o processo de fermentação e a subida ou não das leveduras à superfície. As leveduras típicas usadas neste tipo de fermentação são a *S. cerevisiae* e a *S. pastorianus*, respetivamente (5).

Após 4 a 7 ciclos fermentativos, as leveduras são descartadas, sendo utilizadas na produção de ração para ruminantes e em aquacultura (6). As leveduras, particularmente, a sua parede celular também demonstrou ter bastante interesse devido aos polissacarídeos que a compõem. A parede celular de *S. cerevisiae* e *S. pastorianus* é semelhante, contudo,

é sobre a levedura *S. cerevisiae* que se centram os estudos acerca dos componentes da parede celular (1, 2, 7, 8).

### **1.2.1 Parede celular da levedura**

O peso seco da parede celular da *Saccharomyces cerevisiae* situa-se entre 25 a 30% do peso seco total da célula, representando um investimento de energia metabólica considerável dadas as suas funções (9). Tem quatro funções principais: 1) estabilização da pressão osmótica interna, limitando o influxo de água; 2) proteção contra danos físicos; 3) manutenção da forma celular e 4) suporte a proteínas com funções de proteção contra o ataque de microorganismos estranhos e de retenção de água, prevenindo a desidratação (10).

A percentagem de cada constituinte da parede celular varia consoante as condições de crescimento da levedura e o *stress* a que foi sujeita. A parede celular é composta por, aproximadamente, 29% de glucanas, 31% de manoproteínas, 13% de proteína, 8,5% de lípidos, maioritariamente neutros, e 3% de compostos inorgânicos (11). No entanto, pode existir variabilidade entre estirpes de leveduras que levarão a percentagens diferentes de cada componente da parede celular. Os polissacarídeos podem representar até 85% do peso seco da parede celular, em que entre 80 e 90% são glucanas, entre 10 e 20% são manoproteínas e até 2% são quitina. A parede celular é ainda constituída por aproximadamente 15% de proteína e o conteúdo lipídico pode variar entre 4 e 15% (12-14). Lípidos membranares específicos desempenham um importante papel na regulação de processos celulares vitais e estão envolvidos em vias de sinalização metabólica (14). As proteínas constituintes da parede celular, como já foi referido, podem contribuir para a retenção da água evitando a desidratação. Também participam em eventos de reconhecimento inter-celular, limitam a acessibilidade à membrana plasmática de enzimas, ajudam a fixar metais, como o ferro, e facilitam a captação de esteróis essenciais ao desenvolvimento da levedura. As proteínas presentes na superfície da levedura também permitem o fenómeno da floculação que ocorre durante o processo de fabrico de cerveja e são essenciais em condições anaeróbicas (9, 15, 16).

Na Figura 1 está representada a parede celular fúngica que consiste numa estrutura estratificada composta pelas três macromoléculas principais: as manoproteínas, as glucanas e a quitina (17).

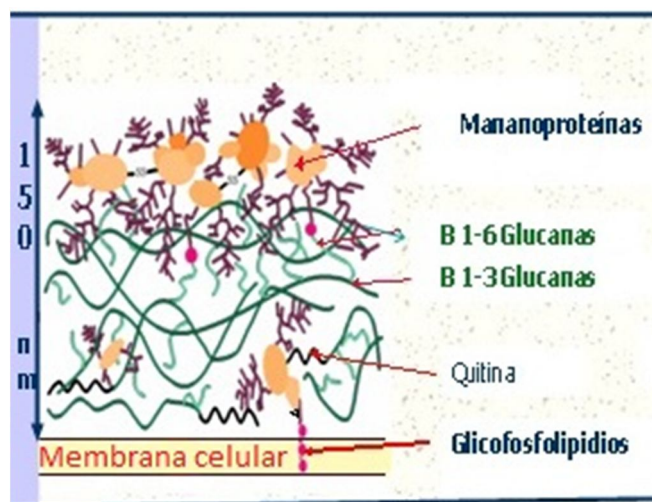


Figura 1 - Representação gráfica da composição da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (adaptado de (18)).

A resistência mecânica da parede celular deve-se sobretudo à camada interna, que consiste essencialmente em glucanas ( $\beta 1 \rightarrow 3$ ) e quitina. A quitina pode estar ligada tanto às glucanas ( $\beta 1 \rightarrow 3$ ) como a uma outra classe presente nas paredes, as glucanas ( $\beta 1 \rightarrow 6$ ). Trata-se de um polímero linear de N-acetilglucosamina com ligações ( $\beta 1 \rightarrow 4$ ). Está dispersa numa pequena quantidade em volta da célula, no entanto, encontra-se em maiores quantidades nos locais de cicatrização do broto que se forma durante a reprodução.

As glucanas ( $\beta 1 \rightarrow 6$ ) são altamente ramificadas, fazendo a ligação entre as glucanas ( $\beta 1 \rightarrow 3$ ) e a camada externa composta por manoproteínas que sobressaem da superfície celular. Estas manoproteínas determinam as propriedades associadas à superfície celular como imunogenicidade, carga eléctrica, hidrofobicidade ou porosidade. Geralmente, as proteínas são altamente glicosiladas com cadeias laterais longas unidas com ligações glicosídicas do tipo *N* ou cadeias mais curtas unidas por ligações glicosídicas do tipo *O*. As proteoglicanas da parede celular da *S. cerevisiae* designam-se por manoproteínas, por a parte glicosídica ser constituída por polímeros de manose. A ligação de cadeias laterais de grupos manosilo, por ligações de tipo *N* ou *O* é feita por pontes fosfodiéster o que vai proporcionar uma superfície celular carregada negativamente explicando a retenção de água e a prevenção de desidratação (16).

As glucanas  $\alpha$ -( $1 \rightarrow 4$ ) são constituintes do glicogénio, um polissacarídeo de reserva a que a célula recorre em períodos de escassez de alimento. Estes polissacarídeos estão ligados, na parede celular, a glucanas em ligação ( $\beta 1 \rightarrow 3$ ) e ( $\beta 1 \rightarrow 6$ ) e podem representar entre 1 a 29% do peso seco da parede celular (Tabela 1). Esta variação pode dever-se à

quantidade de nutrientes disponíveis, às condições ambientais e à fase do ciclo celular em que se encontra a célula (19-21). A sua presença na parede celular poderá nem sempre ser notada, possivelmente devido ao método de extração de polissacarídeos, com lavagens sucessivas e uso de enzimas não seletivas, provocando a sua remoção.

Tabela 1 - Polissacarídeos da parede celular da *S. cerevisiae* (10)

Macromolécula	% de massa na parede celular	Massa molecular média (kDa)	Grau de polimerização	Grau de ramificação
Manoproteínas	30-50	variável	variável	Altamente ramificadas
1,6- $\beta$ -Glucanas	5-10	24	150	Altamente ramificadas
1,3- $\beta$ -Glucanas	30-45	240	1500	Moderadamente ramificadas
Quitina	1,5-6	25	120	Linear
Glicogénio	1-29	-	-	Altamente ramificado

### 1.3 Polissacarídeos da parede celular da levedura

#### 1.3.1 Glucanas

Na parede celular da levedura *S. cerevisiae* são encontrados dois tipos de glucanas: as  $\alpha$ -glucanas e as  $\beta$ -glucanas. As  $\alpha$ -glucanas correspondem ao glicogénio que é um polissacarídeo com ligações ( $\alpha 1 \rightarrow 4$ ) e ramificações em ( $\alpha 1 \rightarrow 4,6$ ) como ilustrado na Figura 2. Dependendo da localização e do método de extração pode apresentar-se sob duas formas: uma citosólica e solúvel e outra insolúvel ligada covalentemente às  $\beta$ -glucanas da parede celular por ligações ( $\beta 1 \rightarrow 6$ ) (20, 21).

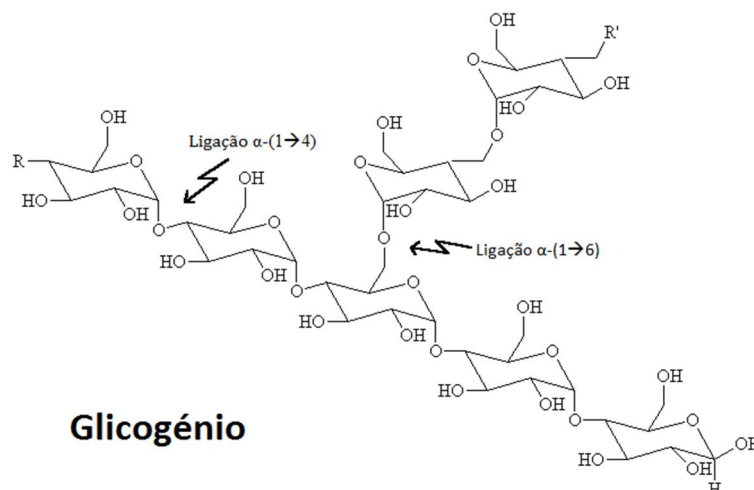


Figura 2 - Representação das ligações glicosídicas do glicogénio (adaptado de (22)).

O maior constituinte da parede celular da *S. cerevisiae* são as  $\beta$ -glucanas que representam cerca de 60% do seu peso seco. As suas propriedades reológicas, como a elevada capacidade de retenção de água e de ligação a óleos conferem-lhes potencial para serem usadas a nível industrial, nomeadamente na indústria alimentar. Apresentam ainda uma elevada viscosidade e capacidade para estabilizar emulsões (23).

As  $\beta$ -glucanas da *S. cerevisiae* podem ser glucanas ( $\beta 1 \rightarrow 3$ ) ou glucanas ( $\beta 1 \rightarrow 6$ ), consoante as ligações glicosídicas entre cada monómero de glucose. A mais abundante é a glucana ( $\beta 1 \rightarrow 3$ ) que consiste num polímero de aproximadamente 1500 monómeros de glucose, tendo um elevado peso molecular, 240 kDa. Cerca de 3-4% de resíduos de glucose da cadeia principal estão ramificadas com cadeias glicosídicas em ligações  $\beta$ -( $1 \rightarrow 6$ ), enrolando-se numa forma helicoidal que confere elasticidade e força tênsil à parede celular (12, 24). É possível a formação de cadeias em tripla hélice estabilizadas pelas cadeias laterais e por três pontes de hidrogénio formadas entre os C-2, representado na Figura 3, no entanto, esta estrutura estará presente apenas nas moléculas de peso molecular acima dos 90 kDa (3). Das ramificações ao longo da cadeia de glucanas ( $\beta 1 \rightarrow 3$ ) resultam múltiplos terminais não-redutores que se podem ligar covalentemente às glucanas ( $\beta 1 \rightarrow 6$ ) ou à quitina (9).

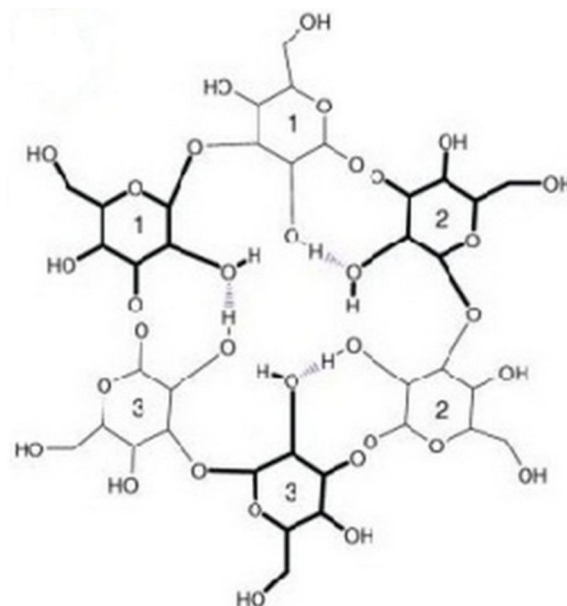


Figura 3 - Pontes de hidrogénio estabelecidas entre as cadeias de glucanas ( $\beta 1 \rightarrow 3$ ) ao longo da estrutura helicoidal tripla (adaptado de (25)).

Na Figura 4 está representado um modelo da cadeia de glucanas ( $\beta 1 \rightarrow 6$ ). Este tipo de estrutura, contrariamente às glucanas ( $\beta 1 \rightarrow 3$ ) são mais curtas, apresentam um comprimento de cadeia de 140 resíduos de glucose e com 15% de ramificações, sendo mais ramificadas que as ( $\beta 1 \rightarrow 3$ ) (26). As cadeias laterais são cadeias curtas de mono ou dissacarídeos em ligações ( $\beta 1 \rightarrow 3$ ) (27). O seu elevado grau de ramificação indica que podem ter a função de ligação entre os diferentes componentes da parede celular (9).

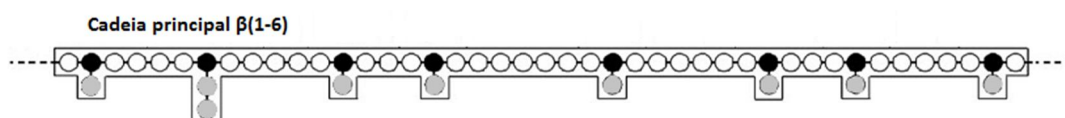


Figura 4 - Modelo da cadeia de glucanas ( $\beta 1 \rightarrow 6$ ) da parede celular da *S. cerevisiae*. Os círculos brancos correspondem a unidades de glucose em ligações ( $\beta 1 \rightarrow 6$ ); os círculos pretos correspondem a unidades de glucose ( $\beta 1 \rightarrow 3, 6$ ); os círculos cinzentos correspondem a unidades de glucose ( $\beta 1 \rightarrow 3$ ) laterais (adaptado de (27)).

Os polissacarídeos da *S. cerevisiae*, nomeadamente as  $\beta$ -glucanas, apresentam uma solubilidade muito baixa. Apenas uma pequena percentagem das glucanas extraídas são solubilizadas permanecendo uma grande maioria insolúvel. A solubilidade das  $\beta$ -glucanas está relacionada com o grau de polimerização. As  $\beta$ -glucanas com um grau de polimerização maior de 100 são insolúveis em água e à medida que este baixa, a

solubilidade aumenta. É possível atribuir às  $\beta$ -glucanas uma classificação segundo as suas propriedades de solubilização em soluções aquosas: a) glucanas ( $\beta 1 \rightarrow 3$ ) alcalino-insolúveis, b) glucanas ( $\beta 1 \rightarrow 3$ ) ácido acético-insolúveis, c) glucanas ( $\beta 1 \rightarrow 3$ ) alcalino-solúveis e d) glucanas ( $\beta 1 \rightarrow 6$ ) solúveis em água (28). As glucanas ( $\beta 1 \rightarrow 3$ ) alcalino-insolúveis são estruturas em tripla hélice, com ramificações  $\beta$ -( $1 \rightarrow 6$ ), estabilizadas por pontes de hidrogénio. A sua ligação covalente à quitina confere-lhes a insolubilidade em meio alcalino (29). As glucanas ( $\beta 1 \rightarrow 3$ ) alcalino-solúveis são similares às alcalino-insolúveis. O seu grau de polimerização é de 1500 e contêm, na sua maioria, ligações ( $\beta 1 \rightarrow 3$ ). No entanto, contêm entre 8 a 12% de resíduos com ligações ( $\beta 1 \rightarrow 6$ ) e entre 3 a 4% de resíduos que estabelecem a ramificação. Portanto a presença destas cadeias ramificadas com ligações ( $\beta 1 \rightarrow 6$ ) parece alterar a solubilidade da molécula (30).

### 1.3.2 Manoproteínas

As manoproteínas constituem a camada externa da parede celular da *S. cerevisiae* e consistem em polímeros de manose covalentemente ligados a proteínas através de ligações do tipo *O* ou do tipo *N*. A fração glicosídica das manoproteínas de *S. cerevisiae* é quase exclusivamente constituída por manose (existe uma pequena quantidade de N-acetilglucosamina nas manoproteínas do tipo *N*). No entanto, em outras espécies de leveduras, é possível encontrar outro tipo de açúcares, como a galactose ou a xilose, a compor as cadeias glicosídicas (9). Os polímeros de manose que se encontram em ligação *N* possuem cadeias glicosídicas longas que se ligam em ( $\alpha 1 \rightarrow 6$ ), podendo chegar a representar 90% da macromolécula. Estas cadeias principais estão ramificadas com cadeias laterais mais curtas em ligações ( $\alpha 1 \rightarrow 2$ ) e com terminais ( $\alpha 1 \rightarrow 3$ ), podendo o seu grau de polimerização variar entre 50 a 200 unidades de manose. As proteínas são glicosiladas através de uma ligação *N* com dois resíduos de N-acetilglucosamina a um resíduo de asparagina da cadeia peptídica (12, 31). A Figura 5A ilustra a estrutura de manoproteínas com ligação do tipo *N* extraídas da *S. cerevisiae*. Os oligossacarídeos em ligação *O* são cadeias curtas até 5 unidades de manose cujos primeiros dois resíduos se encontram ligados em ligação ( $\alpha 1 \rightarrow 2$ ) e os seguintes em ( $\alpha 1 \rightarrow 3$ ). Podem ainda apresentar ramificações em ligação ( $1 \rightarrow 6$ ) que serão menos frequentes que as anteriores. O teor proteico pode variar entre 30 e 50 % neste tipo de manoproteínas. A sua ligação à proteína é feita nos grupos hidroxilo da serina ou da treonina. Uma vez que as proteínas

constituintes da parede celular são ricas em domínios onde constam resíduos de serina e treonina, o número de cadeias em ligação *O* pode ser elevado (12). Na Figura 5B está representada a estrutura das manoproteínas do tipo *O* extraídas da *S. cerevisiae*.

Um aspeto importante na estrutura deste tipo de manoproteínas é a presença de manosilfosfato associado às cadeias laterais de manose. A presença destes resíduos confere carga negativa à superfície celular contribuindo para as propriedades hidrofílicas da parede celular, prevenindo a desidratação e protegendo contra fatores de stress (32).

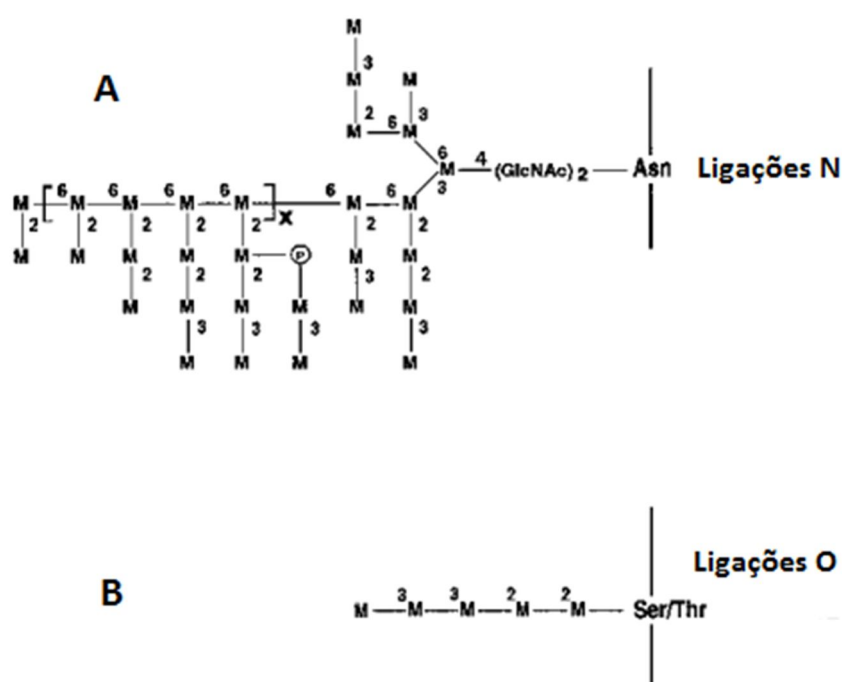


Figura 5 - Estrutura da manoproteínas em ligação do tipo *N* e *O* da *S. cerevisiae* (27).

As proteínas constituintes da parede celular podem ser divididas em duas classes principais: proteínas GPI e proteínas Pir. As proteínas GPI (**G**lycosyl-**P**hosphatidy**I**nositol) são as mais abundantes e contêm regiões ricas em resíduos de serina e treonina. Estão ligadas às glucanas ( $\beta 1 \rightarrow 6$ ) que, por sua vez, estão ligadas às glucanas ( $\beta 1 \rightarrow 3$ ). Numa fase pós secretória da proteína, a âncora GPI é clivada permanecendo apenas um remanescente da ligação às glucanas ( $\beta 1 \rightarrow 6$ ) que envolve etanolamina ligada a fosfato inorgânico que está ligado a um oligossacarídeo composto por quatro ou cinco resíduos de manose. As proteínas Pir (**P**roteins with **I**nternal **R**epeats) estão ligadas às glucanas ( $\beta 1 \rightarrow 3$ ) através de



uma ligação alcalino-sensível que ainda não se encontra caracterizada. Também são proteínas com regiões ricas em resíduos de serina e treonina e pensa-se que poderão estar extensamente manosiladas (9, 12, 16).

A parede celular das leveduras é uma estrutura dinâmica que se adapta a alterações do meio e a processos fisiológicos e de manutenção da espécie. Sempre que é necessário, são ativados mecanismos de sobrevivência que irão remodelar a composição da parede celular (33). A fase do ciclo celular, a disponibilidade de nutrientes e as condições ambientais tais como o pH, a temperatura e a disponibilidade de oxigénio podem induzir em alterações na composição e organização da parede celular das leveduras (16). Esta informação torna-se particularmente importante no setor industrial, tanto alimentar como farmacêutico, onde existe um maior interesse pelas  $\beta$ -glucanas e manoproteínas. As suas propriedades físico-químicas, especialmente as gelificantes e emulsionantes, resultam na sua possível utilização no setor alimentar (23, 34, 35). Também demonstraram possuir propriedades biológicas, como imunoestimuladoras e antitumorais, aumentando o interesse por estes compostos no setor farmacêutico (24, 36, 37).

## **1.4 Efeitos biológicos**

Nas últimas décadas, os polissacarídeos têm vindo a ser isolados e usados como agentes terapêuticos. Entre eles estão os polissacarídeos provenientes da parede celular da levedura cervejeira, cujos efeitos biológicos mais estudados são o imunoestimulador e o antitumoral (1, 38-40). No entanto, os polissacarídeos podem ter outras aplicações como a prevenção contra infeções bacterianas, controlo do colesterol ou cicatrização.

### **1.4.1 Efeito Imunoestimulador**

Os polissacarídeos extraídos da parede celular das leveduras, não sendo sintetizados pelos humanos, são reconhecidos pelo sistema imunitário como moléculas estranhas induzindo respostas do sistema imunitário inato e adquirido. O sistema imunitário inato utiliza uma linha codificada de proteínas ancestral que irão reconhecer patogénios. As células que fazem parte deste tipo de resposta imune, tais como os macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células *Natural Killer* (NK) reconhecem padrões moleculares associados a patogénios (PAMPs) que são altamente conservados

recorrendo a um diverso conjunto de recetores que irão reconhecer esses padrões específicos (PRRs). Quando em contacto com o patógeno, os macrófagos e os neutrófilos podem eliminá-lo diretamente ou, em conjunto com as células dendríticas, ativar uma série de mecanismos que irão retardar a infeção e envolver o sistema imunitário adquirido. A imunidade adquirida baseia-se na expressão de recetores antigénicos na superfície de linfócitos B e T capazes de reconhecer antígenos específicos (41). Enquanto os linfócitos B produzem anticorpos que vão mediar a imunidade humoral, os linfócitos T induzem e regulam a imunidade celular. A imunidade humoral e celular tem o auxílio dos linfócitos T *helper* (Th), cuja diferenciação é promovida por citocinas. As células dendríticas também estão envolvidas na geração da imunidade adquirida pois são estas que apresentam o antígeno aos linfócitos T activando-os (42).

Os polissacarídeos das leveduras, ao serem reconhecidos como PAMPs ligam PRRs desencadeando assim uma resposta imunitária. Podem ser por isso classificados como *Biological Response Modifiers* (BRM). Até ao momento estão identificados vários PRRs capazes de reconhecer polissacarídeos, entre os quais, Recetores *Scavenger* (RS), Dectina-1, Recetores de Manose (RM), Recetor Complemento 3, Recetores *Toll-Like* (TLR) e lactosilceramida (42-44). A especificidade destes recetores não é elevada, permitindo o reconhecimento de vários PAMPs. Na Tabela 2 estão descritos os principais locais de expressão dos PRRs capazes de reconhecer os polissacarídeos BRM. Dos dez TLR identificados nos humanos, apenas os TLR-2 e TLR-4 demonstraram reconhecer os polissacarídeos BRM (45, 46).

Tabela 2 - Locais de expressão dos PRRs associados a polissacarídeos BRM.

PRR	Local de expressão
Recetores <i>Scavenger</i>	Macrófagos e células dendríticas, endoteliais e do músculo liso
Dectina-1/2	Monócitos, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, eosinófilos e linfócitos T e B
Recetores de Manose	Macrófagos, células dendríticas, células hepáticas endoteliais, células mesangiais dos rins, músculo liso traqueal, células epiteliais do pigmento retinal
Recetor complemento 3	Maioritariamente nos macrófagos e neutrófilos e em menor quantidade em subconjuntos de linfócitos T e B e células <i>Natural Killer</i>
Recetores <i>Toll-Like</i>	Macrófagos, células dendríticas e linfócitos B
Lactosilceramida (LacCer)	Neutrófilos, células endoteliais

As células mielóides (macrófagos, monócitos, neutrófilos e células dendríticas), sendo um dos principais alvos dos polissacarídeos BRM, desempenham um importante papel tanto na imunidade inata como adquirida. Na Figura 6 estão representadas as células estimuladas pelas  $\beta$ -glucanas fúngicas, um conhecido BRM, onde é evidenciada a sua capacidade para estimular diferentes células do sistema imunitário. Os monócitos e os macrófagos encontram-se na primeira linha de defesa associada à imunidade inata. Enquanto os monócitos se encontram em circulação nos vasos sanguíneos, os macrófagos resultam de monócitos que migram para o espaço extravascular para diferentes tecidos onde proliferam *in situ*. É comum encontrá-los, ou às suas formas especializadas, em gânglios linfáticos, baço, medula óssea, tecido conectivo perivascular, cavidades serosas, pleura, pulmões, fígado, ossos ou sistema nervoso central (41). A sua estimulação traduz-se num aumento da fagocitose, na produção de espécies reativas de oxigénio ou de azoto como o peróxido de hidrogénio ou o óxido nítrico, na expressão de marcadores de ativação e na secreção de citocinas como TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factor*- $\alpha$ ), IL-1 (interleucina-1), IL-6 e IL-12, contribuindo assim para o processo de inflamação (41, 42). As células dendríticas podem ser de tipo mielóide (também designado por convencional) ou plasmacitoide. As células dendríticas mielóides podem ainda diferenciar-se em intersticiais

e de Langerhans, encontrando-se em circulação na corrente sanguínea ou, sendo intersticiais, em órgãos como os pulmões, o coração ou os rins, ou no epitélio da pele (células de Langerhans) ou nos gânglios linfáticos. Ambas são produtoras de interleucinas e apresentam antígenos aos linfócitos T. As células dendríticas plasmacitoides estão presentes nos órgãos linfóides podendo também encontrar-se em circulação. São produtoras de INF- $\alpha$  (interferão- $\alpha$ ), um potente ativador de fagocitose de patógenos invasores, nomeadamente em resposta a infeções virais. O INF- $\alpha$  também ativa as células NK para que induzam a apoptose das células infetadas e ativa ainda a diferenciação dos linfócitos T em linfócitos T *killer*. Após o contacto com o patógeno, as células dendríticas produzem quimiocinas que atraem linfócitos T *helper*, linfócitos B, células polimorfonucleares e células T de memória e reguladoras que irão atenuar a resposta imunitária assim que a infeção esteja controlada. Os TLRs que são expressos na superfície das células dendríticas irão determinar e modular o tipo de resposta imune induzida (41).

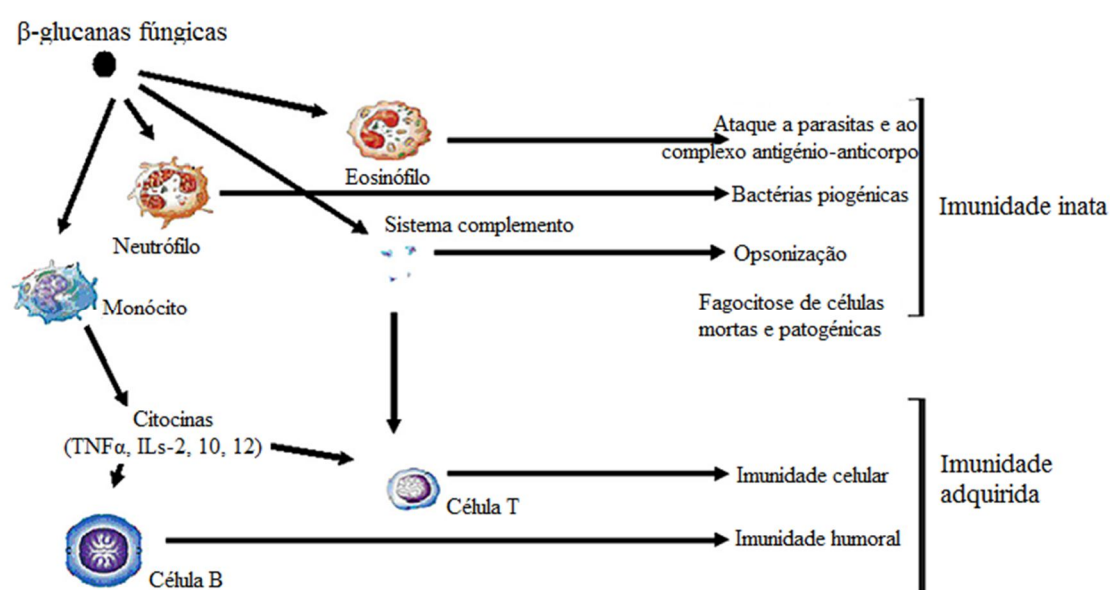


Figura 6 - Células imunoestimuladas pelas  $\beta$ -glucanas fúngicas e respetiva resposta resultante (adaptado de (37)).

As várias células do sistema imunitário podem possuir PRRs em comum, permitindo aos polissacarídeos BRM a estimulação de diferentes populações de células intervenientes na resposta imunitária. No entanto, a estimulação de PRRs diferentes pode resultar em respostas diferentes. A **Dectina-1** e a **Dectina-2** estão envolvidas no reconhecimento e fagocitose de patógenos fúngicos. Fazem parte da família das lectinas

do tipo C, sendo recetores transmembranares do tipo II. Ambas possuem um domínio extracelular de reconhecimento de hidratos de carbono (CRD), uma haste, um domínio transmembranar e, ao contrário da Dectina-2, a Dectina-1 possui ainda um domínio intracelular. O CRD é responsável pelo reconhecimento de hidratos de carbono. A Dectina-1 é o recetor funcional das  $\beta$ -glucanas, as  $(\beta 1 \rightarrow 3)$  e/ou  $(\beta 1 \rightarrow 6)$ . A Dectina-2 é capaz de se ligar a estruturas de manose, nomeadamente a manose em ligação  $\alpha$ . A ativação destes recetores resulta no início de uma série de vias de sinalização do sistema imune inato que resultarão na ativação da fagocitose, produção de ROS e indução de citocinas inflamatórias. A ativação deste recetor por parte de manoproteínas em ligação  $(\alpha 1 \rightarrow 6)$  e  $(\alpha 1 \rightarrow 2)$  induzem a diferenciação celular em linfócitos Th17 e a produção de IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-23. A Dectina-2 é importante na defesa contra infeções pela *C. albicans* por induzir a diferenciação celular em linfócitos Th17 (47). O domínio intracelular da Dectina-1 possui um imunorecetor de tirosina capaz de ativar uma tirosina cinase que, por sua vez, estimula a produção de ROS e também de TNF- $\alpha$  e IL-2, IL-10 e IL-12 (3, 42, 48). Os **Recetores de Manose** também se enquadram na família das lectinas, podendo ter vários domínios semelhantes à lectina numa única cadeia polipeptídica. Possuem um domínio rico em cisteína no terminal N, capaz de se ligar a açúcares sulfatados, seguido de um segundo domínio do tipo da fibronectina. Os RM são capazes de iniciar a fagocitose num processo dependente de actina (43, 49). Estudos realizados em macrófagos e monócitos evidenciaram a sua afinidade para a fração manosilo de manoproteínas do tipo N (50). Os **Recetores do complemento do tipo 3** fazem parte do sistema complemento, um importante componente do sistema imune inato. O sistema complemento é composto por uma série de enzimas plasmáticas e proteínas reguladoras que, por reacções em cascata, podem levar à lise celular ou à geração de fragmentos peptídicos que poderão funcionar como opsoninas, factores quimiotácticos ou anafilatoxinas. A clivagem do fragmento C3, é fundamental na opsonização e consequente facilitação da fagocitose (41). Os Recetores do complemento do tipo 3 são capazes de reconhecer uma vasta gama de ligandos, entre eles as  $\beta$ -glucanas, funcionando como moléculas de adesão. Os recetores possuem dois locais de ligação, um no terminal C onde é feita a ligação às  $\beta$ -glucanas e o segundo no terminal N onde é feita a ligação ao iC3B (*cleaved component 3 fragment of serum complement system*). Quando o recetor do iC3b se encontra ativado, a ligação das  $\beta$ -glucanas ao seu recetor desencadeia processos de fagocitose e desgranulação (3, 42). Os **TLR** são recetores

proteicos transmembranares com sequências repetidas ricas em leucina extracelulares. Respondem à presença de diversos grupos microbianos como fungos, bactérias, vírus e protozoários. Existem cerca de 10 TLRs identificados. Os TLR-4 demonstraram ter uma forte afinidade por glucanas ( $\beta 1 \rightarrow 4$ ) (46). Os TLR-4 também são capazes de interagir com os resíduos de manose de manoproteínas do tipo *O* (50). As  $\beta$ -glucanas presentes na parede celular da *S. cerevisiae*, nomeadamente as glucanas ( $\beta 1 \rightarrow 3$ ), estabelecem ligações com o TLR-2 (45). A ativação deste recetor resulta na produção de citocinas que incluem o TNF- $\alpha$  e a IL-12 e num aumento de NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor- $\kappa$ B), um complexo proteico que controla a transcrição de ADN (3, 41, 42). O TLR-2 pode atuar conjuntamente com a Dectina-1 ampliando-se o sinal de ambos os recetores (51). A **Lacosilceramida** localiza-se na membrana plasmática dos neutrófilos e células endoteliais. Contém uma zona hidrofóbica de ceramida e uma porção hidrofílica de hidratos de carbono sendo capaz de reconhecer células microbiais e glucanas ( $\beta 1 \rightarrow 3$ ) fúngicas. O reconhecimento das glucanas pode induzir diferentes respostas como a produção de citocinas, tais como TNF- $\alpha$  e ROS (3, 42). Os **Recetores Scavenger**, localizados nas células mielóides e endoteliais, fazem parte de um grupo heterogéneo de proteínas com dois domínios transmembranares, dois intracelulares e um extracelular. Estão envolvidos na remoção de diversas substâncias extrínsecas ao organismo e de resíduos provenientes do metabolismo. Sendo capazes de reconhecer uma vasta gama de compostos que incluem lipoproteínas de alta densidade, lipoproteínas de baixa densidade e ligandos polianiónicos. As glucanas ( $\beta 1 \rightarrow 3$ ) são capazes de estabelecer ligações com os RS no entanto ainda é desconhecido o recetor específico. Quando ativados, são desencadeadas uma série de cascatas de sinalização que envolvem MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) e eNOS (*endothelial nitric oxide synthase*) (42).

A estimulação destes PRRs por parte dos polissacarídeos leva à estimulação do sistema imune para eliminação do patógeno.

### **1.4.2 Efeito Antitumoral**

Quando os polissacarídeos com potencial imunoestimulador ativam o sistema imunitário do hospedeiro através da ativação de células NK, macrófagos ou outros leucócitos, induzindo a produção de citocinas inflamatórias, também estão a mediar uma resposta antitumoral. Algumas  $\beta$ -glucanas influenciam a promoção e progressão

cancerígena, nomeadamente ( $\beta 1 \rightarrow 3$ )-glucanas provenientes de algas marinhas, que inibem o crescimento tumoral (52). As  $\beta$ -glucanas fúngicas têm efeito sinérgico com os anticorpos monoclonais usados no tratamentos do cancro. Testes feitos em murganhos mostraram a regressão de neuroblastomas e prolongamento de vida quando foram administradas  $\beta$ -glucanas oralmente conjuntamente com a terapia monoclonal.

Foi demonstrado que os polissacarídeos, nomeadamente as  $\beta$ -glucanas, possuem actividade antitumoral sendo aprovado o seu uso como coadjuvante no tratamento do cancro em humanos no Japão (42).

### **1.4.3 Efeito antibacteriano**

Alguns estudos mostram que as  $\beta$ -glucanas têm um papel protetor contra infeções bacterianas ao elevar a resistência aos patogénios e reduzindo o risco de infeções (37, 53). Extratos de  $\beta$ -glucanos de *S. cerevisiae* mostraram ter atividade antimicrobiana em murganhos contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* resistentes a antibióticos. A ação combinada entre a administração de  $\beta$ -glucanas e antibióticos resultou numa proteção melhorada contra infeções bacterianas em oposição à administração de apenas antibiótico (54). Testes *in vivo* em ratos mostram que o tratamento sistémico com  $\beta$ -glucanas resultam na migração de neutrófilos para o local de inflamação diminuindo ainda o teor bacteriano (55).

### **1.4.4 Controlo do colesterol**

As  $\beta$ -glucanas das leveduras são reconhecidos como seguras para a saúde pública, podendo ser introduzidas como aditivo alimentar. Alguns estudos demonstraram que a administração oral de  $\beta$ -glucanas insolúveis em murganhos permitiu a redução, dependente da concentração de glucanas, dos níveis de colesterol total, LDL e triacilglicerois no sangue. A redução foi mais acentuada em indivíduos hipercolesterolémicos (56, 57). Contudo, o mecanismo pelo qual se dá a redução do colesterol devido às  $\beta$ -glucanas carece de esclarecimento.

### **1.4.5 Atividade cicatrizante**

No processo de cicatrização é essencial o papel desempenhado pelos macrófagos. São responsáveis pela produção de fatores que iniciarão o processo de angiogénese, estimulação da produção de matriz extracelular e promovem a formação de tecido de granulação e epitelização. A ativação de macrófagos por  $\beta$ -glucanas pode levar à diminuição do tempo de cicatrização, redução do tecido cicatricial proporcionando maior força tênsil. Verificou-se que a aplicação direta de  $\beta$ -glucanas sobre úlceras venosas resultou numa cicatrização melhorada com hiperplasia do tecido epitelial, proliferação de fibroblastos e angiogénese (58). Dados experimentais mostraram que a taxa de cicatrização era mais elevada quando era feita a aplicação tópica de  $\beta$ -glucanas em vez de outros polissacarídeos como carragenanas, inulina, amido ou dextrana (8).

## **1.5 Relação atividade-estrutura**

A atividade dos polissacarídeos está relacionada com a sua estrutura. Parâmetros como o peso molecular, o grau de ramificação, a carga, a conformação e a solubilidade vão interferir com o efeito imunoestimulador que o polissacarídeo pode ter. As interações com o recetor vão necessariamente depender do grau de ramificação assim como do tamanho da cadeia e conformação.

Na parede celular de leveduras *Saccharomyces* predominam as manoproteínas e as  $\beta$ -glucanas, tendo ambas demonstrado ter potencial imunoestimulador e antitumoral pela indução da produção de citocinas como TNF- $\alpha$  (1, 59). A capacidade de ligação das manoproteínas aos RM induz uma resposta imunitária. Estão descritos diversos estudos que referem as propriedades imunopotenciadoras das manoproteínas de diversos fungos (36, 59, 60). No entanto, a informação acerca das manoproteínas provenientes da *S. cerevisiae* é escassa. Manoproteínas extraídas da parede celular de fungos, de relativamente baixo peso molecular, 52-65 kDa, demonstraram ter atividade imunoestimuladora (59, 60). As manoproteínas extraídas da *S. uvarum*, com peso molecular de 52 kDa, foram capazes de induzir a produção de imunoglobulinas e, numa resposta secundária, a produção de imunoglobulinas foi maior (59). A *Candida albicans* possui manoproteínas na parede celular (MP65) que são capazes de induzir respostas imunitárias por parte dos Recetores de Manose. As manoproteínas da parede celular da *C. albicans* têm um peso molecular de aproximadamente 65 kDa. A sua estrutura é similar às



manoproteínas da *S. cerevisiae*, no entanto, possuem uma fração ácido-lábil de manose em ligação ( $\beta 1 \rightarrow 2$ ) também se verificando a presença destas ligações na parte terminal da fração estável em meio ácido. Estas ligações constituem antígenos que irão despoletar a ativação de células dendríticas (61). Dos estudos feitos à sua capacidade imunoestimuladora, verificou-se que tinham capacidade de induzir a proliferação de linfócitos T e a sua diferenciação em Th1. As células dendríticas reconhecem este tipo de manoproteínas, não só pelos RM mas também pelo TLR-4. Por o TLR estar envolvido, é induzida a maturação das células dendríticas perante a MP65. Também é promovida a produção de citocinas proinflamatórias tais como o TNF- $\alpha$  e a IL-6. O domínio proteico das manoproteínas da *C. albicans* é essencial, induzindo a resposta dos linfócitos T, enquanto a fração glicosilada promove principalmente a produção de citocinas (60).

As  $\beta$ -glucanas que formam a parede celular da *S. cerevisiae* podem ter ligação em ( $\beta 1 \rightarrow 3$ ) e/ou ( $\beta 1 \rightarrow 6$ ). De acordo com alguns estudos, para se obter atividade imunoestimuladora, é essencial um elevado peso molecular, estrutura em tripla hélice e ramificações em ( $\beta 1 \rightarrow 6$ ). As glucanas ( $\beta 1 \rightarrow 6$ ) são de baixo peso molecular e altamente ramificadas. As glucanas ( $\beta 1 \rightarrow 3$ ) possuem elevado peso molecular, a rondar os 240 kDa, são muito ramificadas e são capazes de formar estruturas em tripla hélice. Estas últimas são responsáveis pela ativação de recetores do sistema imunitário. Para as glucanas ( $\beta 1 \rightarrow 3$ ) extraídas da parede celular da levedura *S. cerevisiae*, apenas as que apresentaram peso molecular maior (100-200 kDa) mostraram atividade imunoestimuladora em detrimento das mais pequenas (5-10 kDa) (62). No entanto, polissacarídeos fúngicos de elevado peso molecular, entre 1400 e 2900 kDa, revelaram uma capacidade de indução da produção de TNF- $\alpha$  menor do que polissacarídeos com peso molecular compreendido entre 280-540 kDa (63). A conformação helicoidal, que é estabelecida por moléculas de maior peso molecular, superior a 90 kDa, também demonstrou ter atividade imunoestimuladora, induzindo a produção de TNF- $\alpha$  (64, 65). Contudo, não é um requisito indispensável, uma vez que algumas estruturas lineares de glucanas ( $\beta 1 \rightarrow 3$ ) tiveram a capacidade de estimular o sistema imunitário (42, 62). O grau de ramificação condiciona a ligação das glucanas ( $\beta 1 \rightarrow 3$ ) aos recetores. Para uma estimulação imunitária máxima o grau de ramificação ótimo situa-se entre 0,2 (1 a cada 5 resíduos) e 0,33 (1 a cada 3 resíduos). No caso da atividade antitumoral, em células de sarcoma 180, as estruturas lineares de glucanas ( $\beta 1 \rightarrow 3$ ) apresentaram atividade, contudo, a adição de ramificações de glucose em ( $\beta 1 \rightarrow 6$ )

levou ao aumento dessa mesma atividade (42). A fração polimérica extraída da parede celular da *S. cerevisiae* induz a produção de TNF- $\alpha$  e a fagocitose através do recetor complemento 3, no entanto a purificação em glucanas ( $\beta 1 \rightarrow 3$ ) com a remoção das manoproteínas resulta numa resposta mais eficaz (66). Na Figura 7 estão representados os principais recetores dos componentes da parede celular da levedura.

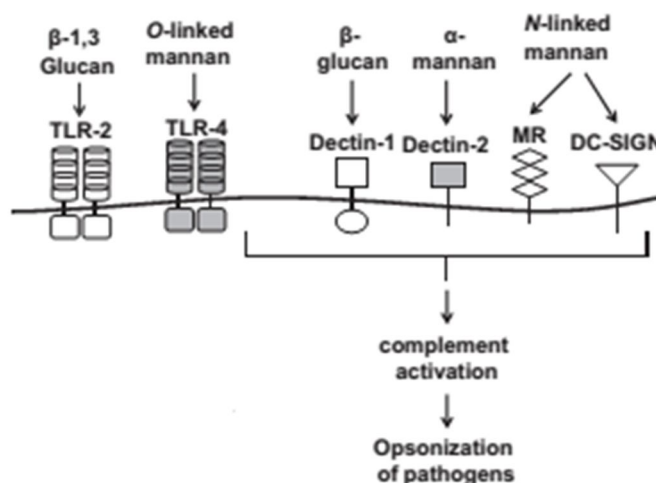


Figura 7 - Componentes fúngicos reconhecidos pelos recetores presentes nas células que levam à sua ativação. (Adaptado de (51))

## 1.6 Extração de polissacarídeos da parede celular de levedura cervejeira

Devido à importância que os polissacarídeos presentes na parede celular da *S. cerevisiae* têm vindo a assumir, torna-se cada vez mais importante desenvolver métodos de extração e purificação que permitam a valorização deste tipo de compostos sem que a sua estrutura seja afetada. Diversos métodos têm vindo a ser aplicados, nomeadamente, extrações alcalinas, ácidas ou a combinação de ambas, assim como extrações com água quente ou hidrólise com proteases (30, 35, 67). Habitualmente, a extração de polissacarídeos da parede celular da *S. cerevisiae* é efetuada recorrendo aos métodos tradicionais como o tratamento alcalino e ácido ou a hidrólise enzimática. Nestes métodos tradicionais, os rendimentos obtidos variam de acordo com a combinação entre as metodologias utilizadas, podendo-se obter rendimentos entre 22 e 40% de extração de ( $\beta 1 \rightarrow 3$ )-glucanas ou entre 14 e 37% de extração de manoproteínas (13, 35, 68, 69). Devido à insolubilidade dos polissacarídeos, o rendimento de extração recorrendo a estas metodologias é baixo. Então, surge a necessidade de métodos de extração não destrutivos dos polissacarídeos mas que permitam obter bons rendimentos de extração. Recentemente,

foram aplicadas novas metodologias que podem ser usadas em combinação com os métodos tradicionais. A extração recorrendo a ultrassons, alta pressão ou microondas têm demonstrado ser métodos eficientes com rendimentos de extração de polissacarídeos superiores àqueles atingidos com as metodologias anteriores (69-72). O rendimento de extração de polissacarídeos de cogumelos com a extração assistida por micro-ondas face à metodologia tradicional de extração com água quente apresentou um aumento de 58% (73). O rendimento de extração de açúcares recorrendo ao micro-ondas pode depender de vários fatores como o tempo de extração, a potência do micro-ondas, a temperatura atingida ou o rácio entre a amostra e a água. Foi demonstrado que extrações de apenas 3 minutos a 200°C permitiram a extração de 87% de açúcares constituintes das arabinogalactanas e galactomananas de borras de café. Nestas condições a celulose apresenta uma taxa de extração de apenas 6% (70). No entanto, para outro tipo de polissacarídeos, tal como as arabinoxilanas, durante 2 minutos a 180°C são extraídos 62% das arabinoxilanas presentes na dreche cervejeira (74). As condições de micro-ondas variam dependendo do tipo de polissacarídeos e da sua sensibilidade à temperatura.

Ainda não há estudos da aplicação de metodologias de extração de polissacarídeos recorrendo a MW em polissacarídeos da levedura. Estas novas metodologias apresentam vantagens, nomeadamente, um possível maior rendimento de extração. Para além disso, este tipo de metodologias podem permitir a extração dos polissacarídeos recorrendo apenas a soluções aquosas (70, 71).

## **1.7 Âmbito do trabalho**

Perante as potencialidades oferecidas pelos polissacarídeos presentes na parede celular da *S. cerevisiae*, com este trabalho pretende-se valorizar a levedura excedentária da indústria cervejeira. Para tal efetuou-se:

- Extração sequencial dos polissacarídeos da parede celular da levedura cervejeira excedentária recorrendo à técnica assistida por microondas em meio aquoso.
- Caracterização estrutural dos extratos obtidos, nomeadamente das manoproteínas e glucanas.

- Fracionamento dos extratos obtidos com vista ao seu enriquecimento em polissacarídeos.
- Avaliação do potencial imunoestimulador *in vitro* dos extratos obtidos através de testes de ativação de recetores em linfócitos B e T do baço de murganhos.

## **2. Material e métodos**



## **2.1 Amostra**

Neste trabalho foi utilizada como objeto de estudo levedura cervejeira excedentária cedida pela empresa UNICER, S. A. Segundo a empresa, trata-se de uma levedura da espécie *Saccharomyces pastorianus* que tinha sido utilizada em 3 ou 7 ciclos fermentativos e recolhida por sedimentação natural.

## **2.2 Isolamento das paredes celulares da amostra**

Os polissacarídeos com interesse biológico encontram-se maioritariamente na parede celular das leveduras tornando-se importante o seu isolamento por forma a descartar conteúdo citosólico. Foram utilizados dois métodos de autólise para a obtenção da fração da parede celular.

### **2.2.1 Autólise térmica**

Para proceder à obtenção da parede celular da levedura, esta foi submetida a uma banho de 80°C durante 4 h sob agitação a 400 rpm, tendo sido aumentada a temperatura para 100°C durante 10 minutos para a inativação de enzimas líticas. Após o arrefecimento desta mistura, foi centrifugada a 15000 rpm, a 4°C durante 15 minutos e lavada 3 vezes. O sobrenadante foi concentrado em evaporador rotativo, a 40°C, lavado 2 vezes com água destilada e novamente concentrado. Tanto o precipitado como o sobrenadante foram recolhidos e liofilizados.

### **2.2.2 Autólise por sonicação**

A sonicação também foi usada como método de autólise num processo denominado por sonoporação. A aplicação de frequências ultrasónicas pode ser usada como forma de alterar a permeabilidade da parede celular de células levando à perda da sua viabilidade.

Uma suspensão celular foi submetida ao processo de disrupção por sonicação recorrendo a um equipamento Sonics Vibra Cell (Modelo VC 130). Com a suspensão celular num banho de gelo, de forma a evitar o sobreaquecimento, a uma amplitude de 60%, num total de 48 minutos em pulsos de 2:4 minutos (on:off). Decorrida a sonicação, o resíduo foi centrifugado a 15000 rpm, a 4°C durante 15 minutos e lavado 3 vezes. O sobrenadante foi concentrado em evaporador rotativo, lavado 2 vezes com água destilada e

novamente concentrado. Tanto o precipitado como o sobrenadante foram recolhidos e liofilizados. Este método foi realizado com no trabalho desenvolvido por Shokri *et al.* (67).

## 2.3 Microscopia ótica

A levedura cedida pela UNICER foi observada ao microscópio ótico antes e depois do processo de autólise. As células foram diluídas 1:160 em água e observadas numa ampliação de 400x. A viabilidade celular foi aferida recorrendo ao corante Trypan Blue (75). Uma vez que quando a membrana celular se encontra íntegra esta impede a entrada na célula de determinados corantes como o Trypan Blue, é possível inferir a viabilidade celular através da cor apresentada pelas células. Assim, as células viáveis terão um citoplasma claro, ao contrário das células comprometidas, que permitiram a entrada do corante e apresentar-se-ão azuis.

A coloração celular foi feita misturando 10 µL de suspensão celular com 10 µL de corante. Desta mistura, utilizaram-se 10 µL para contagem em câmara de Neubauer. O cálculo da percentagem de células viáveis foi feito recorrendo à seguinte fórmula:

$$\% \text{ células viáveis} = \frac{(\text{número células claras})}{(\text{número células totais})} * 100$$

## 2.4 Microscopia eletrónica de varrimento

As imagens de microscopia eletrónica de varrimento foram adquiridas usando um microscópio Hitachi SU70 SEM Field Emission Gun a operar a 15 kV. As amostras foram colocadas num suporte de alumínio e cobertas com um filme de carbono.

## 2.5 Determinação do teor de humidade e de sólidos totais

O teor de humidade e sólidos foi determinando com base na perda do peso das amostras depois de secas na estufa. Foram utilizadas 5 caixas de pesagem por cada amostra. As caixas de pesagens utilizadas foram secas na estufa a 105° C durante 1 hora tendo sido pesadas, após o seu arrefecimento num exsiccador. Dispuseram-se 8 g de amostra em cada uma das caixas de pesagem e colocaram-se na estufa a 105°C durante 2 horas. Decorrido o tempo de secagem, as caixas com a amostra foram deixadas a arrefecer num exsiccador durante 30 minutos e pesadas. O processo de secagem e pesagem foi repetido até se verificar um peso constante.



O cálculo da percentagem de humidade e sólidos foi feito recorrendo às seguintes fórmulas:

Fórmula 1:

$$\% \text{ sólidos} = \frac{(\text{massa amostra seca})}{(\text{massa amostra inicial})} \times 100$$

Fórmula 2:

$$\% \text{ humidade} = 100 - \% \text{ sólidos}$$

## **2.6 Extração sequencial dos polissacarídeos da parede celular da levedura excedentária**

Os polissacarídeos presentes na parede celular da levedura excedentária foram extraídos de forma sequencial através de extrações aquosas assistidas por micro-ondas (MW) utilizando o equipamento EthosSYNTH Labstation (output máximo, 1 kW, 2.45 GHz; Milestone Inc., Shelton, CT) em reatores de 100 mL resistentes a altas temperaturas e pressões. Os reatores são compostos por politetrafluoroetileno e <1% de éter perfluoropropílico de vinilo, que lhes confere resistência a temperaturas até 250°C e pressões até 55 bar. A temperatura da reação e a pressão no interior do reator foram monitorizadas.

O precipitado resultante da autólise foi submetido a 4 ciclos de extração com água. Para tal, e tendo sido a experiência conduzida em duplicado, foi colocado dentro de dois reatores 60 mL de suspensão de precipitado em água numa proporção de 1:28 de resíduo seco:água (m/v). Sob agitação constante, ambos os reatores foram sujeitos à extração com água sobreaquecida em forno de micro-ondas durante 2 minutos a 180°C, tendo sido atingida uma pressão máxima de 11 bar. Decorrida a extração, e após despressurização, a amostra foi recolhida e centrifugada a 15000 rpm, a 4°C durante 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido e do precipitado recolheu-se uma pequena parte para liofilização para posteriores análises, tendo o restante sido sujeito ao segundo ciclo de extração nas condições descritas anteriormente. No terceiro e quarto ciclos de extração foi utilizada uma temperatura de 200°C, tendo-se atingido uma pressão máxima de 16 bar. Os 4 sobrenadantes recolhidos foram sujeitos a precipitações em solução de etanol a 80% (v/v), tendo ficado sob agitação a 4°C durante 2 horas, promovendo-se a precipitação de

material polimérico, que foi recolhido por centrifugação a 15000 rpm, a 4°C durante 10 minutos. Seguidamente, o etanol e a água foram maioritariamente removidos em evaporador rotativo, concentrando a amostra, tendo sido feitas 2 lavagens com água destilada de forma a garantir a completa remoção de etanol e nova concentração da amostra. Desta forma, obtiveram-se 4 extratos: Et80.1, Et80.2, Et80.3 e Et80.4. Após os 4 ciclos de extração em microondas restou um resíduo final que foi recolhido e liofilizado. Na Figura 8 está esquematizado o processo de extração aquosa sequencial de polissacarídeos assistido por micro-ondas.

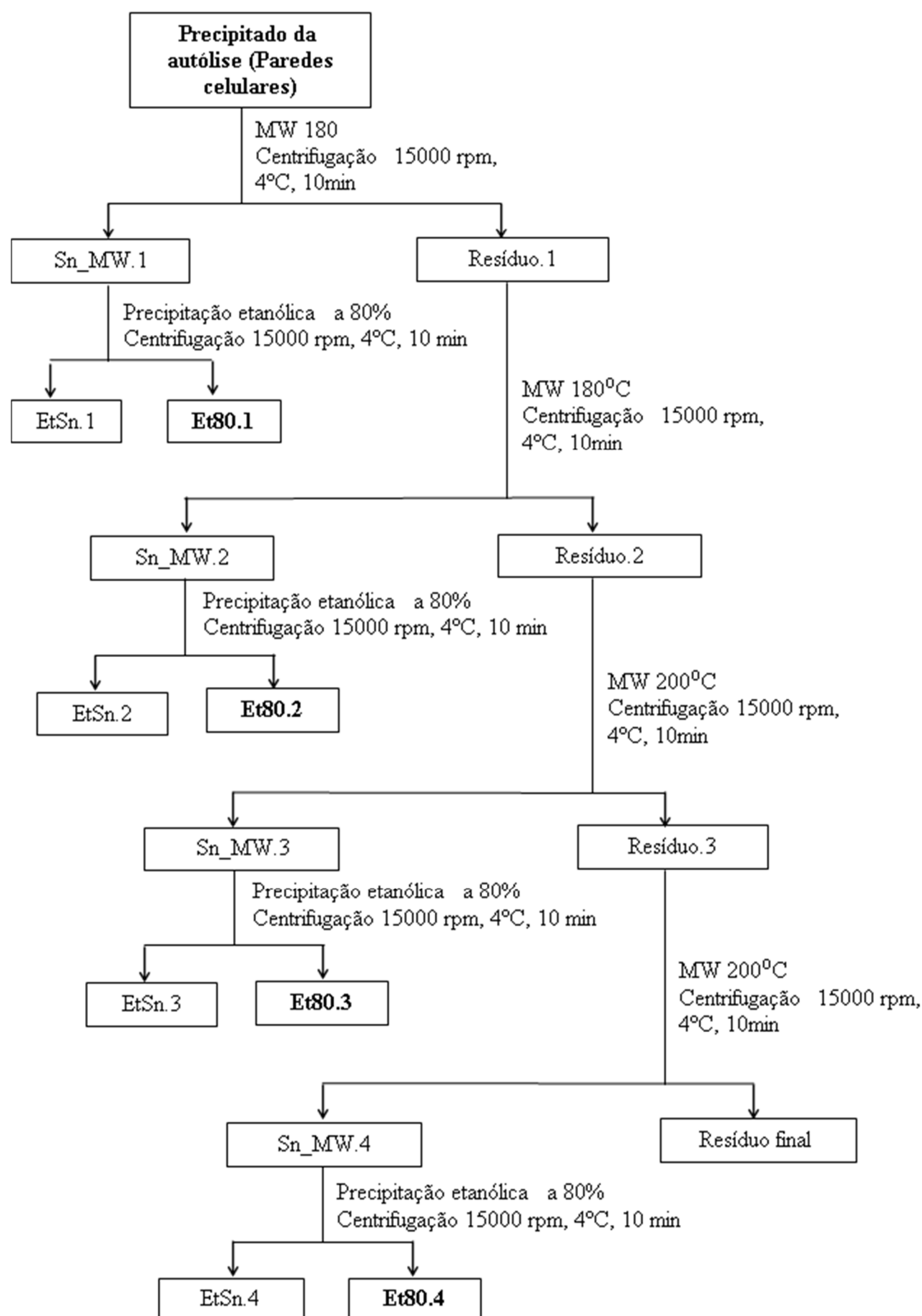


Figura 8 - Representação esquemática da extração sequencial dos polissacarídeos da levedura cervejeira excedária.

## 2.7 Análise de açúcares

### 2.7.1 Análise de açúcares neutros

A quantificação de açúcares neutros presentes nos polissacarídeos foi feita em dois passos. Num primeiro passo, procedeu-se à hidrólise ácida dos açúcares promovendo a sua despolimerização seguindo-se a redução e acetilação onde se dá a conversão dos monossacarídeos em acetatos de alditol para que sejam analisados por GC-FID (76, 77).

A hidrólise dos polissacarídeos decorreu em tubos de cultura para onde se pesou entre 1 a 2 mg de amostra e adicionou 200  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  72% (m/m) deixando-se incubar durante 3 horas à temperatura ambiente com agitação ocasional. Desta forma, ocorreu a solubilização e hidratação dos polissacarídeos. De seguida adicionaram-se 2,2 mL de água destilada de forma a que a concentração de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  atinja 1 M, deixando-se hidrolisar a 100° C durante 1 hora. Decorrido esse tempo, os tubos foram arrefecidos para se poder retirar 0,5 mL de hidrolisado para posterior determinação de ácido urónicos. A hidrólise decorreu por mais 1,5 h tendo-se, de seguida, arrefecido os tubos em gelo de modo a parar a reação.

Seguidamente foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de 2-desoxiglucose 1 mg/mL a cada tubo, como padrão interno. Fez-se a transferência de 1 mL desta solução para novos tubos de cultura e neutralizou-se com 200  $\mu\text{L}$  de  $\text{NH}_3$  a 25%. A redução dos monossacarídeos foi feita adicionando 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaBH}_4$  15% (m/v) em  $\text{NH}_3$  3 M (preparada imediatamente antes) e deixando reagir durante 1 h a 30°C. Após a redução, os tubos foram arrefecidos em gelo e foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de ácido acético glacial duas vezes de forma a eliminar o excesso de  $\text{BH}_4^-$ . De seguida foi feita a transferência de 300  $\mu\text{L}$  da solução para tubos SOVIREL.

Para a reação de acetilação ocorrer adicionaram-se, num banho de gelo, a cada tubo 450  $\mu\text{L}$  de 1-metilimidazol, como catalizador da reação, e 3 mL de anidrido acético. Após agitação, os tubos foram colocados a incubar durante 30 minutos a 30° C para formar os acetatos de alditol. Após arrefecer os tubos em gelo, adicionaram-se 3 mL de água destilada para decompor o excesso de anidrido acético e 2,5 mL de diclorometano para extrair para a fase orgânica os acetatos de alditol através de uma agitação manual vigorosa. Centrifugou-se a 3000 rpm durante 30 segundos de forma a separar a fase orgânica da fase aquosa, sendo esta última removida por sucção. À fase orgânica foi novamente adicionada água destilada e diclorometano nas mesmas quantidades anteriores, tendo-se repetido o

processo. Foram feitas mais duas lavagens com 3 mL de água destilada, garantindo a completa remoção do 1-metilimidazol. A fase orgânica obtida foi transferida para tubos *speedvac* e o diclometano foi evaporado no concentrador de amostras. Após a total remoção do diclometano, os acetatos de alditol foram lavados com 1 mL de acetona anidra que também foi evaporada tendo-se repetido-se este passo novamente.

Os acetatos de alditol foram dissolvidos em 50 µL de acetona anidra. Os acetatos de alditol foram analisados por cromatografia em fase gasosa com detetor de ionização em chama (GC-FID) recorrendo a um cromatógrafo Perkin Elmer – Clarus 400 com uma coluna capilar DB-225 (30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro, 0,15 µm de espessura) sendo a fase estacionária composta por 50% de cianopropil-fenilo e 50% metilpolisiloxano. A injeção foi realizada em modo “split” sendo a temperatura do injetor de 220°C e a do detetor de 230°C. O gás de arraste utilizado foi o hidrogénio, a uma pressão de 17 psi. O programa de temperaturas utilizado foi o seguinte: temperatura inicial de 200°C, aumento até 220°C a 40°C/min, mantendo-se a esta temperatura por 7 minutos, seguido-se de um aumento até 230°C a 20°C/min, mantendo-se a esta temperatura durante 1 minuto.

### **2.7.2 Determinação de ácidos urónicos**

A quantificação dos ácidos urónicos foi feita com base no trabalho desenvolvido por Blumenkrantz e Asboe Hansen (1973) (78). Foram feitas soluções padrão de ácido galacturónico de concentrações crescentes, 0, 5, 10, 15 e 20 µg/mL. Durante a hidrólise realizada para análise dos açúcares neutros, foram retirados 0,5 mL de hidrolisado que foram diluídos em 1,5 mL de água destilada. Transferiram-se 500 µL de cada solução (amostra e padrões) para 3 tubos de ensaio. Com os tubos num banho de gelo, adicionaram-se 3 mL de ácido bórico 50 mM preparado em ácido sulfúrico concentrado, agitaram-se manualmente e taparam-se com folha de papel de alumínio e foram colocados, num banho a 100°C durante 10 minutos.

Depois dos tubos arrefecidos, foram adicionados 100 µL de MFF (*m*-fenilfenol 0,15% (m/v) NaOH) a 2 dos 3 tubos de cada amostra e padrão. Os tubos foram manualmente agitados e deixados a reagir no escuro durante 30 minutos. Decorrido o tempo de reação, os tubos foram novamente agitados e foi lida a sua absorvância a 520 nm.

### **2.7.3 Análise colorimétrica de açúcares totais**

Esta metodologia foi utilizada como forma de detetar a presença de açúcares nas frações recolhidas durante a separação dos polissacarídeos por cromatografia de exclusão molecular descrita em 2.7, utilizando como base o procedimento descrito por Dubois *et al.* (79). Em tubos de ensaio foram colocados 100 µL de amostra e 200 µL de solução aquosa de fenol a 5%. Com os tubos num banho de gelo, adicionou-se 1 mL de ácido sulfúrico concentrado e, após a agitação manual dos tubos, taparam-se com folha de papel de alumínio e colocaram-se num banho a 100°C durante 10 minutos. Depois de arrefecidos, deixaram-se os tubos no escuro durante 30 minutos. Decorrido o tempo de reação, os tubos foram novamente agitados e foi lida a sua absorvância a 490 nm.

## **2.8 Análise de ligações glicosídicas por metilação**

As ligações glicosídicas estabelecidas entre os monossacarídeos constituintes dos extratos Et80 foram analisadas pelo método proposto por Ciucanu e Kerek (80). Este método propõe a metilação dos grupos hidroxilo livres, seguindo-se a hidrólise dos polissacarídeos, a redução dos monossacarídeos aos respetivos alditóis e a acetilação dos grupos hidroxilo livres (que estabeleciam no polissacarídeo ligações glicosídicas ou que estavam envolvidos na formação do anel do açúcar) obtendo-se acetatos de alditol parcialmente metilados (PMAA). Os PMAA foram analisados por cromatografia em fase gasosa acoplada a um espetrómetro de massa com quadrupolo como analisador (GC-qMS).

Em tubos *speedvac* foram secas entre 1 a 2 mg de amostra na estufa de vazio sob vácuo durante 2 h na presença de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Para a dissolução das amostras, foi adicionado 1 mL de DMSO tendo-se deixado sob agitação durante a noite. Sob atmosfera de árgon foram adicionados às amostras completamente dissolvidas 40 mg de NaOH (s) triturado, ficando sob agitação. Decorridos 30 minutos é feita a adição de 80 µL de iodeto de metilo, que reagiu durante 20 minutos de forma a promover a reação de metilação, tendo-se repetido este passo. Após a reação de metilação foram adicionados 3 mL de uma solução de clorofórmio e metanol na proporção de 1:1 em volume. As amostras foram dialisadas em mangas de diálise de poro 12-14 kDa contra uma solução de etanol:água destilada na proporção de 1:1 em volume. Depois de 2 mudas da diálise, as amostras foram recolhidas e levadas à secura no concentrador de amostras para serem novamente metiladas de modo a garantir a completa metilação da amostra, tendo-se repetido todo o processo desde a

dissolução da amostra em DMSO. Após a obtenção do material metilado, este foi sujeito às reações de hidrólise, redução e acetilação, resultando os PMAA.

A hidrólise foi feita adicionando 500 µL de TFA 2 M, deixando a reação ocorrer a 121°C durante 1 h com agitações ocasionais. Decorrido o tempo de reação, o ácido foi evaporado num concentrador de amostras. De seguida adicionaram-se 300 µL de NH<sub>3</sub> 2 M e 20 mg de NaBD<sub>4</sub>, tendo a redução ocorrido ao longo de 1 h a 30°C. Decorrida a reação de redução, os tubos foram arrefecidos num banho de gelo, tendo-se adicionado 2 vezes 50 µL de ácido acético glacial de modo a eliminar o excesso de BD<sub>4</sub><sup>-</sup>. A acetilação e extração líquido-líquido ocorreram da mesma forma que a análise de açúcares neutros descrita no ponto 2.6.1.

Os acetatos de alditol parcialmente metilados foram dissolvidos em 50 µL de acetona anidra para serem analisados por GC-qMS, recorrendo a um cromatógrafo Agilent Technologies 6890N Network com uma coluna capilar DB-1 (30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro e 0,15 µm de espessura). Foram injetados 0,2 µL de amostra com o injetor a uma temperatura de 220°C em modo “split” de 5 min tendo-se utilizado hélio como gás de arraste. O programa de temperaturas utilizado foi o seguinte: temperatura inicial de 50° C, aumento até 140°C a 8°C/min tendo-se mantido esta temperatura durante 5 min, seguindo-se um aumento até aos 150° C a 0,5° C/min tendo ocorrido um novo aumento até aos 280° C a 40° C/min tendo-se mantido nesta temperatura durante 1 min.

## **2.9 Cromatografia de Exclusão Molecular (SEC)**

Os extratos recolhidos durante a extração sequencial em MW foram submetidos à análise por Cromatografia de Exclusão Molecular (SEC).

### **2.9.1 Cromatografia de Exclusão Molecular Analítica**

Cerca de 5 mg de extrato foram dissolvidos em 700 µL de solução eluente de NaNO<sub>3</sub> 8,5 g/L. As amostras solubilizadas foram analisadas recorrendo a um cromatógrafo PL-GPC110 – Polymer Laboratories. Recorrendo a uma reta de calibração usando pululanos de massa molecular entre 0,7-100 kDa foi possível inferir qual o tamanho do/s polímeros/s presente/s na amostra.

### **2.9.2 Cromatografia de Exclusão Molecular Preparativa**

A cromatografia de exclusão molecular preparativa foi utilizada para separar os polissacarídeos presentes nos extratos Et80.1 e Et80.4 obtidos na extração sequencial assistida por MW descrita em 2.5.

A separação dos polissacarídeos foi feita recorrendo a uma coluna XK-26 utilizando gel Sephacryl 200-HR (S-200) cujos limites de inclusão e exclusão se situam entre 1 e 80 kDa, respectivamente. O gel utilizado encontrava-se numa solução 50:50 água:etanol tendo sido empacotado numa coluna de 59 cm x 2,6 cm. A coluna foi lavada com tampão fosfato 0,1 M e ureia 3 M (pH 6,5) a um fluxo de 1 mL/min recorrendo a uma bomba peristáltica. De seguida foi feita a calibração da coluna com vista a determinar o seu volume de exclusão e inclusão. Para tal dissolveram-se cerca de 5 mg de dextrana azul e 5 mg de glucose em tampão e eluíram-se na coluna. A dextrana azul permite aferir o volume de exclusão uma vez que se trata de um polímero de elevado peso molecular, 2000 kDa, sendo possível acompanhar o seu deslocamento ao longo da coluna devido à sua coloração azul. A glucose indicou o volume de inclusão da coluna. Após a sua aplicação na coluna, o volume eluído começou a ser recolhido para uma proveta. Quando a dextrana azul de aproximou do fundo da coluna começaram a ser recolhidas frações de 1,5 mL até perfazer o volume total da coluna. Dessas frações foi recolhida uma aliquota para detetar a presença de polissacarídeos pelo método de fenol-ácido sulfúrico, descrito em 2.5.4, e determinação do perfil cromatográfico com a informação dos volumes de exclusão e inclusão.

Com o objetivo de separar os polissacarídeos de diferentes pesos moleculares presentes na amostra, esta foi dissolvida em 1 mL de tampão e introduzida na coluna. Foram recolhidas frações de 1,5 mL até ao volume de inclusão, num total de 125 frações, tendo sido recolhida uma aliquota de cada fração para deteção de polissacarídeos por análise colorimétrica de açúcares totais, descrita em 2.6.3. Pelos cromatogramas obtidos foi possível agrupar as 125 frações em apenas 3 que foram concentradas, dialisadas em membranas de diálise de poro 12 a 14 kDa a 4°C e liofilizadas. Depois de liofilizadas foram sujeitas à análise de ligações glicosídicas por metilação (ponto 2.7) e ao estudo do seu potencial imunoestimulador (ponto 2.13).



## 2.10 Determinação de proteína

### 2.10.1 Proteína total

O teor de proteína total do precipitado de autólise e resíduo final foi determinado através da análise elementar por combustão recorrendo ao equipamento Truspec 630-200-200 com detetor de condutividade térmica. Para a determinação do teor de proteína foi considerado o fator de Kjeldahl de 6,25 multiplicando-se pelo teor de nitrogénio obtido na análise elementar.

### 2.10.2 Proteína solúvel

A determinação da proteína solúvel foi feita pelo método do ácido bicinconínico (BCA). Este método apresenta menor variabilidade que o método de Bradford e pode ser aplicado numa larga escala de concentrações de proteína. Baseia-se na reação de biureto em que ocorre a redução de  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^{+}$  pelas proteínas em meio alcalino, sendo que a redução é proporcional à quantidade de proteína presente na amostra. A alta afinidade do BCA ao catião  $\text{Cu}^{+}$  em ambiente alcalino, forma um complexo de cor púrpura com o máximo de absorvância a 562 nm, permitindo avaliar a concentração de proteína solúvel na amostra.

A proteína solúvel total nos extratos obtidos na reação em MW foi determinada recorrendo a este método a partir de uma reta de calibração construída com o padrão de albumina de soro bovino (BSA) com concentrações entre 0,0 e 1,0 mg/mL. Foi utilizado o protocolo para volumes reduzidos tendo-se realizado a experiência e a leitura das absorvâncias diretamente numa **placa de cultura**. Primeiramente preparou-se a solução de trabalho em que se mistura 50 partes de uma solução de ácido bicinconínico, carbonato de sódio, tartrato de sódio e bicarbonato de sódio em NaOH 0,1 M com pH final de 11,25 com 1 parte de uma solução de sulfato de cobre penta-hidratado 4% (m/v). Em cada poço da placa foram colocados 25  $\mu\text{L}$  de solução padrão ou amostra e 200  $\mu\text{L}$  de solução de trabalho. A placa foi colocada na estufa a 60°C durante 15 minutos e após o seu arrefecimento foi lida a absorvância a 562 nm.

## 2.11 Determinação de aminoácidos

A determinação dos aminoácidos constituintes da amostra é efetuada em duas fases. Na primeira é feita a hidrólise ácida do material proteico num protocolo adaptado de

Zumwalt *et al.* (81). Desta forma, são obtidos os aminoácidos constituintes das proteínas presentes na amostra. De seguida foi feita a derivatização dos aminoácidos para análise por GC-FID baseado no trabalho de MacKenzie (82).

Para tubos *speedvac* foram pesadas 5 mg de amostra em base seca à qual foi adicionado 1 mL de HCl 6 M. A hidrólise do material proteico decorreu ao longo de 24 h a 110°C sob atmosfera de azoto. Após o arrefecimento dos tubos foi adicionado o padrão interno que consiste em 500 µL de norleucina 5,0 µmol/mL em HCl 0,1 M e o conteúdo dos tubos foi evaporado no concentrador de amostra até à secura. De seguida, foram ressuspensas em 1 mL de HCl 0,1 M, filtradas com filtros de 0,45 µm e novamente evaporadas até à secura.

A derivatização dos aminoácidos ocorreu ao longo dos processos seguintes. Foi feita a adição de 200 µL de isobutanol em HCl 3 M e deixou-se reagir por 10 minutos a 120°C. Os tubos foram agitados num vortex voltando novamente a reagir a 120°C durante 30 minutos. Decorrido o tempo de reação, os tubos foram arrefecidos à temperatura ambiente e o excesso de reagente evaporado no concentrador de amostra. Depois de seco, foi adicionado 200 µL de BHT preparado em acetato de etilo tendo sido também evaporado completamente. De seguida adicionou-se 100 µL de anidrido heptafluorobutírico e reagiu a 150°C durante 10 minutos, sendo posteriormente evaporado no concentrador de amostra após o arrefecimento dos tubos. O conteúdo nos tubos foi dissolvido em 50 µL de acetato de etilo e analisados por GC-FID utilizando um cromatógrafo Perkin Elmer – Clarus 400 com uma coluna capilar DB-1 com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro e 0,15 µm de espessura com a fase estacionária composta por dimetilpolisiloxano. Foram injetados 2 µL sendo a temperatura do injetor de 250°C e a do detetor de 260°C. O gás de arraste utilizado foi o hidrogénio e o programa de temperaturas foi o seguinte: temperatura inicial de 70°C mantendo-se durante 1 minuto, aumento até aos 170°C a 2°C/min, seguiu-se um aumento até aos 250°C a 16°C/min mantendo-se a esta temperatura durante 5 minutos.

## 2.12 Hidrólises enzimáticas

O extrato Et80.4 foi submetido à ação da  $\alpha$ -amilase e celulase em ensaios isolados, hidrolisando as ligações glicosídicas e ( $\alpha/\beta 1 \rightarrow 4$ ), respetivamente, para uma melhor

compreensão da estrutura da amostra. Este protocolo baseou-se no trabalho desenvolvido por Dikit (83).

### **2.12.1 $\alpha$ -amilase**

O extrato Et80.4 sofreu a hidrólise das ligações ( $\alpha 1 \rightarrow 4$ ) pela ação da  $\alpha$ -amilase de *Bacillus subtilis* 62 U/mg numa reação de 2 h a 25°C, tendo-se usado 10 mg de amostra em 5 mL de tampão fosfato 0,1 M pH 7,0. Como controlos positivo e negativo foram utilizados amilose e papel higiénico (celulose), respetivamente, em substituição da amostra.

### **2.12.2 Celulase**

O extrato Et80.4 sofreu a hidrólise das ligações  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) pela ação da celulase de *Aspergillus niger* 1,5 U/mg numa reação de 4 h a 37°C, tendo-se usado 10 mg de amostra em 5 mL de tampão acetato 20 mM pH 5,0. Como controlos positivo e negativo foram utilizados papel higiénico (celulose) e amilose, respetivamente, em substituição da amostra.

Após cada uma das hidrólises, foi necessária a inativação das enzimas utilizadas colocando os tubos contendo as amostras num banho a 100°C durante 10 minutos. De seguida, as amostras e controlos foram dialisadas em mangas de diálise com poros de 12 a 14 kDa contra água destilada a 4° C. Após 5 mudas as amostras foram liofilizadas para posterior análise de ligações glicosídicas.

## **2.13 Determinação da presença da conformação em tripla hélice**

Segundo o trabalho desenvolvido por Ogawa *et al.* a conformação helicoidal das ( $\beta 1 \rightarrow 3$ ) glucanas é alterada em condições alcalinas (84). Quando exposta a concentrações alcalinas elevadas, a estrutura ordenada helicoidal é destruída devido à ionização dos grupos hidroxilo resultando na quebra das ligações por pontes de hidrogénio e a conformação torna-se aleatória. O Congo Red é um corante capaz de formar complexos com a estrutura em tripla hélice não interagindo com outros polissacarídeos. Desta forma é possível monitorizar a alteração de conformação através da alteração do pico de absorvância entre a amostra em tripla hélice complexada com o Congo Red e a amostra com uma conformação aleatória que não irá interagir com o corante. Este estudo foi

efetuado à amostra Et80.4 de forma a avaliar a presença/ausência da estrutura em tripla hélice.

Foram preparadas soluções de 0,5 mg/mL de amostra em condições alcalinas de NaOH a diferentes concentrações: 0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,5 M contendo Congo Red 42 µM. De seguida foi obtido o espectro de absorção entre 300 e 700 nm.

## **2.14 Ensaios de imunoestimulação**

Foram realizados ensaios que permitiram avaliar o potencial imunoestimulador de algumas amostras obtidas, os extratos Et80.1 e Et80.4, as 3 frações recolhidas durante a separação por cromatografia de exclusão molecular de cada um destes extratos e o extrato recolhido após a hidrólise do extrato Et80.4 com  $\alpha$ -amilase. Este estudo permitiu avaliar a capacidade das amostras em estimular linfócitos para uma resposta imunitária.

### **2.14.1 Obtenção dos esplenócitos**

Inicialmente foi necessário fazer a recolha das células do baço de um murgancho. O baço é responsável pela produção de linfócitos atuando também como reservatório de eritrócitos (85). O ratinho é sacrificado de uma forma rápida e indolor através de um deslocamento da cervical. Após a sua desinfeção com etanol 70%, em câmara de fluxo laminar, é feita uma incisão na zona abdominal e a pele é afastada de forma a expor o peritонеu parietal. Uma nova incisão é feita do lado esquerdo do abdómen tornando o baço acessível. Com o auxílio de uma pinça e uma tesoura o baço é removido gentilmente com o mínimo possível de tecido adiposo e colocado numa solução de RPMI numa caixa de Petri. Com o auxílio de duas agulhas, os esplenócitos foram libertados para o meio e com uma pipeta os aglomerados foram removidos. De seguida, as células em solução foram filtradas em lã de vidro de forma a remover qualquer resíduo de gordura, tecido capsular ou aglomerado celular. As células foram centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos e ressuspensas em RPMI de forma a ter-se cerca de  $6 \times 10^6$  células/mL. O RPMI é um meio de suspensão celular que contém antibiótico e nutrientes de forma a manter a integridade celular. Para a preparação do RPMI completo foram necessários 50 mL de RPMI-1640 ao qual foram adicionados 500 µL de tampão HEPES pH 7,5, 300 µL de uma solução

contendo penicilina 100 IU/mL e estreptomicina 50 mg/mL, 5 mL de soro bovino fetal (FBS) e 25 µL de 2-mercaptoetanol.

### **2.14.2 Incubação de células com amostra**

Em poços de uma placa de cultura foram colocados 100 µL de suspensão celular. Nos poços correspondentes ao controlo negativo colocaram-se mais 100 µL de RPMI e nos poços correspondentes ao controlo positivo colocaram-se 2 µL de solução de LPS de *Salmonella abortus equi* (Sigme, St. Louis) e 98 µL de RPMI. Para os poços restantes foram pipetados 50 µL de amostra dissolvida em tampão PBS, a diferentes concentrações, de polissacarídeos no poço da placa, e o volume foi completado com RPMI até aos 200 µL. As células foram deixadas em incubação durante 12 h a 37°C em atmosfera húmida a 95% e 5% de CO<sub>2</sub>.

### **2.14.3 Incubação de células com CLI**

Nos poços de uma placa de cultura foram colocados 100 µL de suspensão celular. De seguida adicionaram-se 20 µL de solução CLI-095 10 µg/mL (InvivoGen, USA), que também se pode denominar por TAK-242 ((6R)-6-[N-(2-cloro-4-fluorofenil)sulfamoi] ciclo-hex-1-ene-1-carboxilato de etilo) de forma a atingir-se uma concentração de 1 µg/mL no poço e 30 µL de RPMI. Nos poços de controlo de atuação do CLI relativamente a cada amostra adicionaram-se 50 µL de RPMI. As células foram deixadas em incubação durante 6 h a 37°C em atmosfera húmida a 95% e 5% de CO<sub>2</sub>. Decorrido o tempo de incubação com CLI foram adicionadas as amostras e os controlos. Como controlo positivo usou-se RPMI, o LPS de *Salmonella abortus equi* (Sigme, St. Louis) foi usado como controlo positivo e o PAM (R-848, Pam2CSK4), como agonista do TLR2/6, foi usado como controlo destes recetores de forma a descartar a possibilidade da sua interação do CLI. Assim, nos controlos negativos foi adicionado 50 µL de RPMI, aos controlos positivos adicionaram-se 2 µL de LPS e 48 µL de RPMI e, para o controlo do TLR2, foram adicionados 2 µL de PAM e 48 µL de RPMI. De cada amostra foram adicionados 50 µL a cada poço de forma a obter-se uma concentração de 50 µg/mL. As células foram deixadas em incubação durante 12 h a 37° C em atmosfera húmida a 95% e 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **2.14.4 Marcação celular**

Depois do período de incubação das células com as amostras, estas foram centrifugadas a 1500 rpm durante 7 minutos tendo sido descartado o sobrenadante. De seguida foi feita a marcação com os anticorpos monoclonais, tendo-se usado o anti-CD69-PE (Biolegend) para marcar células ativadas, o anti-CD3 (Bioscience) como marcador de linfócitos T e o anti-IgM como marcador de linfócitos B. Cada marcador emite fluorescência num comprimento de onda distinto, à exceção do anti-IgM que necessita a sua conjugação com o fluoróforo avidina, permitindo ao citómetro distinguir entre as diferentes células ativadas. Num eppendorf foi feita uma mistura dos anticorpos usados na marcação, diluídos na proporção de 1:100 com tampão FACS, uma solução salina com 10 mmol/L de azida de sódio e 1 % de BSA. Após a adição de 25 µL da mistura de anticorpos, as células permaneceram em incubação durante 30 minutos no escuro à temperatura ambiente. Decorrido o tempo de incubação, as células foram centrifugadas a 1500 rpm durante 7 minutos tendo-se descartado o sobrenadante. De seguida foram adicionados 25 µL do fluoróforo avidina-Cy5 diluído na proporção de 1:100 em tampão FACS para que este se ligasse ao anti-IgM, deixando-se incubar durante 30 minutos no escuro à temperatura ambiente. Depois da incubação repetiu-se o processo de centrifugação descartando-se o sobrenadante e lavaram-se as células 3 vezes adicionando 150 µL de tampão FACS, centrifugando a 1500 rpm durante 7 minutos e descartando o sobrenadante de forma a remover anticorpos não ligados. As células foram ressuspensas em 150 µL de tampão FACS e transferidas para tubos de citómetros onde foram diluídas em 400 µL de tampão FACS. A leitura das células foi feita recorrendo a análise por citometria de imunofluorescência utilizando um citómetro de fluxo EPICS XL com *software* EXPO32ADC (Beckman Coulter).

### **3. Resultados e discussão**





### 3.1 Processo de autólise

Como forma de obtenção das paredes celulares da levedura foram utilizados dois processos de autólise celular, um associado a elevadas temperaturas e outro associado a ultrassons. A levedura foi observada microscopicamente antes e depois da autólise recorrendo à coloração com Trypan Blue. Na Figura 9A encontra-se uma fotografia da levedura antes de sofrer autólise onde é possível verificar que a grande maioria apresenta uma coloração clara, indicando a sua viabilidade. Após contagem celular recorrendo à câmara de Neubauer foi possível verificar que cerca de 86% das células se encontravam viáveis. Pelo contrário, 100% das células observadas após ambos os processos de autólise, representadas na Figura 9B e 9C, encontram-se inviáveis, no entanto, as células mantêm a sua forma esférica manifestando a resistência das estruturas que compõem a parede celular a condições adversas.

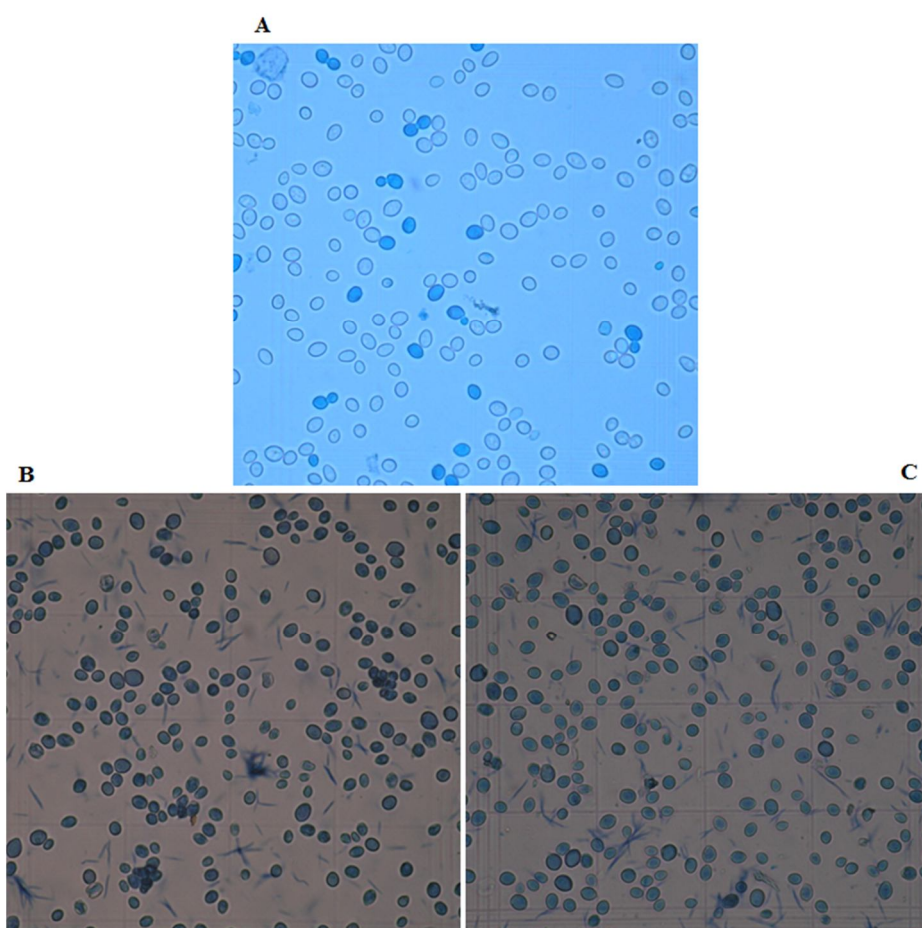


Figura 9 - Observações microscópicas da levedura com ampliação de 400X corada com Trypan Blue. Em A observa-se a levedura antes de sofrer qualquer processo de autólise. Em B e C observa-se a levedura após o processo de autólise térmica e sonicação, respetivamente.

Após os processos de autólise foi efetuada a análise aos açúcares constituintes de cada resíduo obtido, em triplicado, apresentando-se na Tabela 3 a média dos resultados obtidos.

Tabela 3 - Análise aos hidratos de carbono presentes nos resíduos e sobrenadantes resultantes dos processos de autólise térmica e sonicação.

Levedura excedentária		$\eta$ (%)	$\eta$ açúcares extraídos (%)	% mol									Açúcares totais ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )
				dRib	Rha	Rib	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Ác. Ur.	
Inicial				2	v	2	1	v	24	v	66	5	458
Autólise térmica	Res	37	33	3	v	2	v	-	34	-	58	3	413
	Sn	25	25	2	v	3	4	4	9	v	75	3	463
Autólise por Sonicação	Res	55	48	4	v	4	v	-	34	v	52	5	394
	Sn	21	22	4	v	v	5	5	5	v	77	2	469

v-Quantidades vestigiais; Res-Resíduo; Sn-Sobrenadante

O teor de humidade e de sólidos da levedura excedentária utilizada neste trabalho foi determinado tendo-se obtido o valor de 83,8% e 16,2%, respetivamente. Depois da autólise térmica da levedura obteve-se um resíduo com 37% de massa em base seca em que cerca de 41% são açúcares dos quais a glucose (58%) e a manose (34%) são os maioritários. Foram também determinados outros açúcares minoritários (2/3%) tais como a desoxirribose, a ribose, a arabinose e os ácidos urónicos. Com autólise por sonicação foi possível a extração de 55% de resíduos que consistiam em 39% de açúcares, sendo a manose (34%) e a glucose (52%) os maioritários. Também foi possível a extração de desoxirribose, ribose e ácidos urónicos num teor mais baixo, entre 4 e 5%. De acordo com a literatura, a parede celular da levedura do género *Saccharomyces* tem como principais constituintes a glucose e a manose que constituem as glucanas e as manoproteínas, respetivamente, encontrando-se os resultados obtidos de acordo com o descrito (13).

A análise aos açúcares neutros presentes nos resíduos e sobrenadantes resultantes dos processos de autólise revelou que ambos os processos demonstraram ter uma eficácia similar, não se tendo verificado vantagens significativas com a sonicação, um método relativamente recente de autólise, em oposição à autólise térmica. Uma vez que o teor de açúcares obtidos entre os dois métodos de autólise foi semelhante, e sendo este um método

já amplamente utilizado, a extração de polissacarídeos da levedura que a seguir se descreve só foi feita ao resíduo resultante da autólise térmica.

### 3.2 Extração sequencial assistida por micro-ondas

O resíduo da autólise térmica foi submetido ao processo de extração sequencial assistida por micro-ondas. A experiência foi conduzida em duplicado, tendo-se utilizado dois reatores. A análise de açúcares foi feita em triplicado e na Tabela 4 encontra-se a média dos resultados. Entre os reatores utilizados na extração verificaram-se algumas discrepâncias, nomeadamente ao nível dos rendimentos de extração. Nestes casos, o resultado é apresentado com os dois valores.

Tabela 4 - Análise de açúcares neutros e rendimentos da extração sequencial assistida por MW.

Amostra		$\eta$ (%) (res aut)	$\eta$ (%) (aç extr)	$\eta$ (%) Man	$\eta$ (%) Glc	% mol						Açúcares totais ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )
						dRib	Rib	Ara	Man	Glc	Ác. Ur.	
1º Ciclo 180º	Et80.1	11,3/18,3	12,2/23,9	28,1/53,9	3,3/6,6	2	4	-	76	16	5	493
	EtSn1	8,7	3,2	3,8	1,1	5	35	-	37	19	1	152
	Res.1	-	-	-	-	2	1	-	20	72	2	457
2º Ciclo 180º	Et80.2	5,6/11,2	5,3/14,6	7,4/19,3	4,1/10,8	4	1	2	43	42	3	464
	EtSn2	5,8	1,4	1,6	0,6	14	24	1	35	23	2	99
	Res.2	-	-	-	-	2	-	-	14	81	4	377
3º Ciclo 200º	Et80.3	15,6	24,0	8,6	34,0	2	-	1	12	82	1	635
	EtSn3	11,0	4,5	5,6	3,8	1	5	3	40	49	3	168
	Res.3	-	-	-	-	2	-	-	9	84	8	248
4º Ciclo 200º	Et80.4	5,0	9,5	2,8	13,8	2	-	1	10	84	3	799
	EtSn4	4,8	1,2	1,2	1,3	4	1	5	30	56	3	113
	RF	30,6	12,6/18,4	2,4	16,2/27,5	20	-	-	5	80	1	208

v-quantidades vestigiais; Aç-açúcares; Extr-extraídos; Res-resíduo

Ao longo dos ciclos de extração foram recolhidos extratos ricos em polissacarídeos. Os rendimentos mássicos apresentam alguma variabilidade entre reatores ao longo das extrações. No primeiro ciclo, a 180°C, obteve-se 11 e 18% de massa relativamente ao resíduo de autólise. Neste extrato foi possível extrair 12 e 24% de açúcares. Com a segunda extração foi possível obter extratos cujo rendimento mássico foi de 6 e 11%.

Também o teor de hidratos de carbono extraídos foi menor, de 5 e 15%. Ao aumentar a temperatura da extração para 200°C, no terceiro ciclo, foi possível aumentar novamente o rendimento para 16% aumentando também a extração de açúcares. O menor rendimento de extração foi obtido no último ciclo onde se obteve apenas 5% de massa relativamente ao precipitado de autólise. Neste ciclo foram solubilizados apenas 10% de açúcares. O resíduo final ainda representa 31% da massa do precipitado de autólise.

Ao longo dos 4 ciclos foram extraídos polissacarídeos de forma sequencial. Nos dois primeiros ciclos, a 180°C, foi extraída maioritariamente manose. Nos terceiro e quarto ciclos, a 200°C, extraiu-se maioritariamente glucose. No entanto, no resíduo final ainda permaneceram polissacarídeos que não foram extraídos. No final dos 4 ciclos extrativos verificou-se uma perda de cerca de 13% de açúcares, inerentes às sucessivas transferências de material e/ou a degradação de açúcares. Entre os dois reatores verificaram-se diferenças no rendimento de extração de manose nos dois primeiros ciclos. No reator A, a extração da manose foi repartida entre o primeiro e o segundo ciclo, pelo contrário, no reator B, a manose foi maioritariamente extraída no primeiro ciclo. Totalizando os dois primeiros ciclos, foi possível solubilizar quantidades aproximadas de manose 47% e 61% no reator A e B, respectivamente. No reator A verificou-se que no segundo ciclo foram extraídos 11% de glucose juntamente com 19% de manose.

A glucose foi maioritariamente extraída no terceiro e quarto ciclos. Nestes dois ciclos a 200°C solubilizando-se 82 e 84% no terceiro e quarto ciclos, respetivamente.

Os sobrenadantes do etanol são muito pobres em açúcares, 10-17%, sendo constituídos maioritariamente por manose e glucose. Provavelmente devido a um baixo peso molecular, estas moléculas permanecem solúveis em solução apesar da elevada percentagem de etanol. Nos dois primeiros ciclos a percentagem mais elevada de desoxirribose e ribose e o baixo teor em açúcares mostra que podem estar presentes ácido desoxirribonucleico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA). O resíduo final é constituído por material polimérico pobre em açúcares, cerca de 21% sendo maioritariamente glucose.

Aos resíduos obtidos ao longo das extrações foram efetuadas observações em microscopia eletrónica de varrimento com deposição de carbono (Figura 10). O Resíduo.1 foi obtido no final do primeiro ciclo, o Resíduo.2 foi obtido no final do primeiro e segundo ciclos e assim sucessivamente até ao resíduo final. Na figura 10 é possível observar que a

estrutura esférica é conservada mesmo após quatro ciclos de micro-ondas. Como já foi reportado, a estrutura esférica da parede celular da *S. cerevisiae* era mantida mesmo após vários métodos de extração de polissacarídeos (13). Ao longo das extrações é possível observar que as células aparentam ficar mais transparentes e com um número maior de perfurações, que variam entre 100 nm e 1 µm no quarto ciclo.

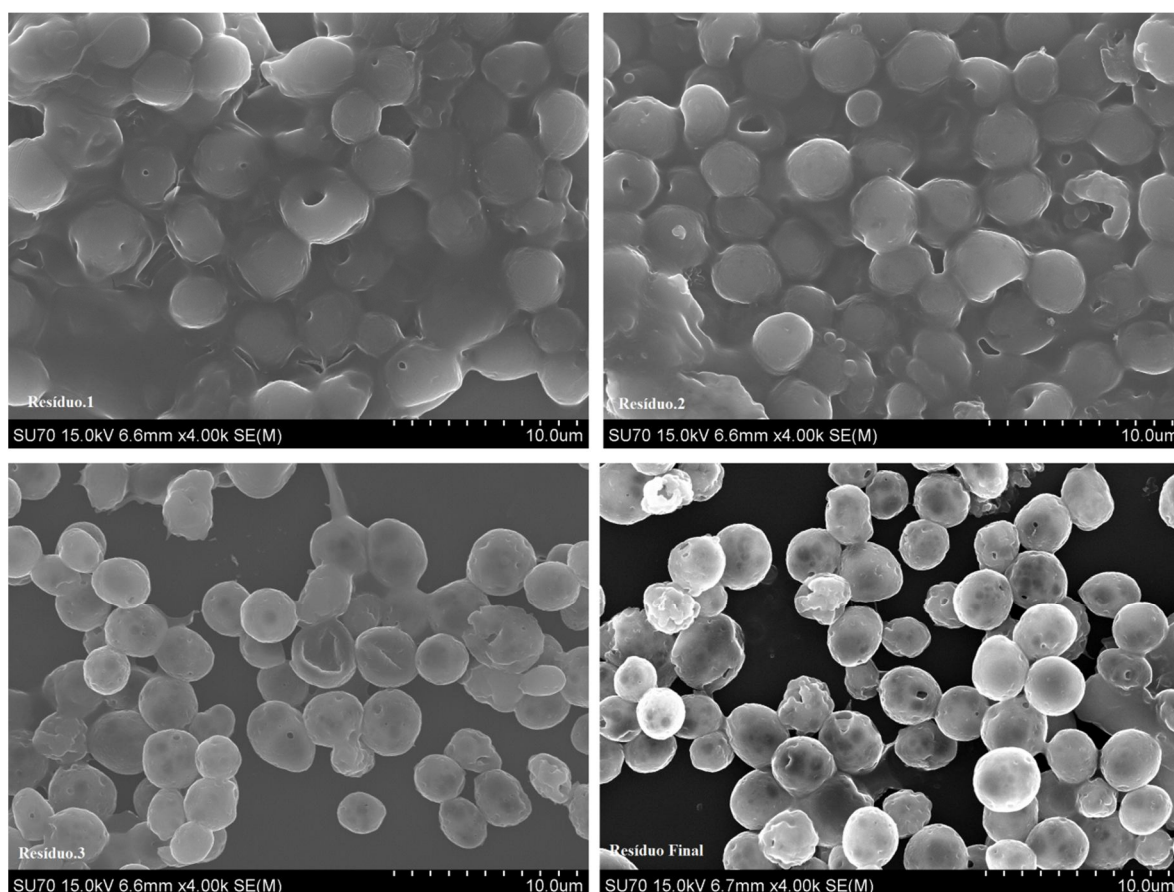


Figura 10 - Observações microscópicas em microscopia eletrônica de varrimento dos resíduos de micro-ondas.

### 3.2.1 Análise de ligações glicosídicas

Com o objetivo de determinar o tipo de ligações glicosídicas estabelecidas nos polissacarídeos foi efetuada uma análise por metilação aos extratos obtidos na extração sequencial após precipitação em etanol. Na tabela 6 é possível encontrar o tipo de resíduos presentes em cada extrato de cada reator e a respectiva percentagem na amostra. Comparando o tipo de hidratos de carbono obtidos e a sua percentagem na amostra com os resultados obtidos da análise de açúcares neutros não se verifica uma grande disparidade exceto no que diz respeito à percentagem molar dos açúcares referentes ao segundo ciclo.

Tabela 5 - Ligações glicosídicas dos extratos ricos em polissacarídeos (Et80) obtidos durante a extração sequencial assistida por MW, sendo expressa a média dos dois reatores. Entre parentesis estão os valores relativos à fração molar obtidos por análise de açúcares neutros por GC-FID.

Ligação glicosídica	Fração (% mol)				Resíduo Final
	Et80.1	Et80.2	Et80.3	Et80.4	
t-Ara	0,1	-	-	-	-
<b>total</b>	<b>0,1 (v)</b>	-	-	-	-
4-Xyl	0,2	-	-	-	-
<b>total</b>	<b>0,2 (0)</b>	-	-	-	-
t-Man	22,2	25,2	5,8	4,6	1,7
2-Man	17,7	13,7	4,3	5,3	0,8
4-Man	0,4	-	-	-	-
3-Man	8,5	6,0	-	-	-
6-Man	1,7	2,4	0,4	-	-
2,3-Man	0,2	-	-	0,3	0,7
2,6-Man	24,5	16,6	3,9	3,4	4,7
3,6-Man	0,9	-	-	-	-
2,3,6;2,4,6-Man	0,9	-	-	-	-
<b>Total</b>	<b>77,0 (75)</b>	<b>63,9 (43)</b>	<b>14,4 (13)</b>	<b>13,6 (14)</b>	<b>8,0 (5)</b>
t-Glc	1,2	4,3	8,9	9,3	5,9
3-Glc	1,3	2,6	1,5	32,3	44,8
4-Glc	14,4	25,5	66,1	33,7	13,4
6-Glc	1,0	1,6	1,9	5,5	6,2
4,6-Glc	1,2	0,9	5,8	3,1	2,3
3,6-Glc	-	-	-	1,9	5,1
3,4-Glc	-	-	0,2	-	0,6
<b>Total</b>	<b>19,2 (16)</b>	<b>34,8 (42)</b>	<b>84,3 (81)</b>	<b>85,8 (83)</b>	<b>78,3 (87)</b>
4-GlcNAc	0,2	-	0,8	-	3,7
<b>Total</b>	<b>0,2</b>	-	<b>0,8</b>	-	<b>3,7</b>

v - Quantidades vestigiais

No material polimérico obtido no primeiro ciclo e precipitado a 80% de etanol (Et80.1) era constituído maioritariamente por manose em ligação (1→2,6)-Man, t-Man, (1→2)-Man, (1→3)-Man e (1→6)-Man. A elevada abundância de resíduos (1→2,6)-Man (24,5%) indica a presença de manoproteínas muito ramificadas. De acordo com a literatura, as manoproteínas da parede celular da levedura podem ser constituídas por resíduos de manose em ligação ( $\alpha$ 1→6), com ramificações em ( $\alpha$ 1→2,6) que prosseguem em cadeias curtas em ligação ( $\alpha$ 1→2) e alguma dessas cadeias terminam com uma ligação em ( $\alpha$ 1→3) (12). Verifica-se uma pequena percentagem de 0,2% de (1→4)-GlcNAc neste

extrato que poderá fazer parte da ligação entre a fração glicosídica e a fração proteica das manoproteínas do tipo *N*, que envolve 2 resíduos glucosamina em ligação (1→4) (12). Neste extrato também estão presentes resíduos de glucose, 14,4% em ligação (1→4) e (1→4,6)-Glc, que poderão ser de glicogénio. A razão entre (1→4)-Glc e (1→4,6)-Glc é 12, similar ao encontrado no glicogénio (20).

No segundo ciclo de extração, os resíduos de mannose maioritários, são os mesmos que se encontraram no 1º ciclo, sendo o mais abundante a t-Man, o que poderá significar despolimerização. A presença de 17% de resíduos 2,6-Man mostra desramificação em relação ao 1º ciclo. Também existe 26% de glucose em ligações (1→4) mas, uma vez que apenas foram quantificados 0,4% de glucose em ligação (1→4,6), esta estrutura será menos ramificada que a anterior, o que está de acordo com a desramificação verificada para as manoproteínas.

No terceiro ciclo de extração, a 200°C, cerca de 66% dos resíduos de glucose encontravam-se em ligação (1→4) e 6% em ligação (1→4,6), verificando-se uma razão entre (1→4)-Glc e (1→4,6)-Glc de 11, sendo indicativo da presença de glicogénio. Também foram extraídos resíduos de manose em ligação terminal, (1→2), (1→2,6) e (1→6). Os resíduos extraídos são consistentes com uma estrutura de manoproteínas muito ramificada.

Os extratos poliméricos obtidos na quarta extração são maioritariamente constituídos por resíduos de (1→3)-Glc (32%) e (1→4)-Glc (34%). A presença de resíduos de (1→3)-Glc indicam a presença de glucanas ( $\beta$ 1→3). Adicionalmente observa-se a presença de 1,9% de resíduos (1→3,6)-Glc e 5,5% de (1→6)-Glc, indicando a presença de ramificações (razão 3-Glc/3,6-Glc = 0,06). Ainda neste 4º ciclo se verificou a presença de resíduos 4-Glc e 4,6-Glc indicadores da presença de glicogénio cuja a razão 4-Glc/4,6-Glc também foi de 11, semelhante ao extraído no ciclo anterior. O glicogénio, pelo facto de estar ligado covalentemente às  $\beta$ -glucanas (20), poderá ser difícil de extrair. Ainda se verificou a presença de 14% de manose, das quais 5% se encontravam em ligação (1→2) com 3% de ramificações em (1→2,6) e apenas 0,3% de ramificações em (1→2,3).

Quanto ao resíduo final, é possível verificar a presença de 43% de resíduos de glucose em ligação (1→3). Também neste resíduo está presente o maior teor de 4-GlcNAc, 4%, correspondendo possivelmente à quitina.

### 3.2.2 Determinação da presença da conformação em tripla hélice

Para avaliar a possibilidade da ocorrência da estrutura em tripla hélice das  $\beta$ -glucanas em ligações ( $\beta 1 \rightarrow 3$ ) ao extrato Et80.4 foi medida a interação com o corante Congo Red em meio alcalino. O Congo Red forma um complexo com estruturas em tripla hélice que pode ser avaliado através do desvio do comprimento de onda máximo de absorção a diferentes concentrações de hidróxido de sódio. Concentrações alcalinas elevadas levam à destruição da estrutura ordenada das glucanas por ionização dos grupos hidroxilo e consequente eliminação das ligações de hidrogénio, resultando numa estrutura aleatória, com um máximo de absorção diferente da do Congo Red, como se ilustra na Figura 11A através de um exemplo da bibliografia (84). A Figura 11B mostra o máximo de absorvância das soluções de NaOH com Congo Red e das soluções de NaOH com Congo Red e o extrato Et80.4. O comportamento da solução do Congo Red com a amostra é semelhante ao comportamento da solução controlo de Congo Red, não se verificando alterações significativas nos máximos de absorvância.

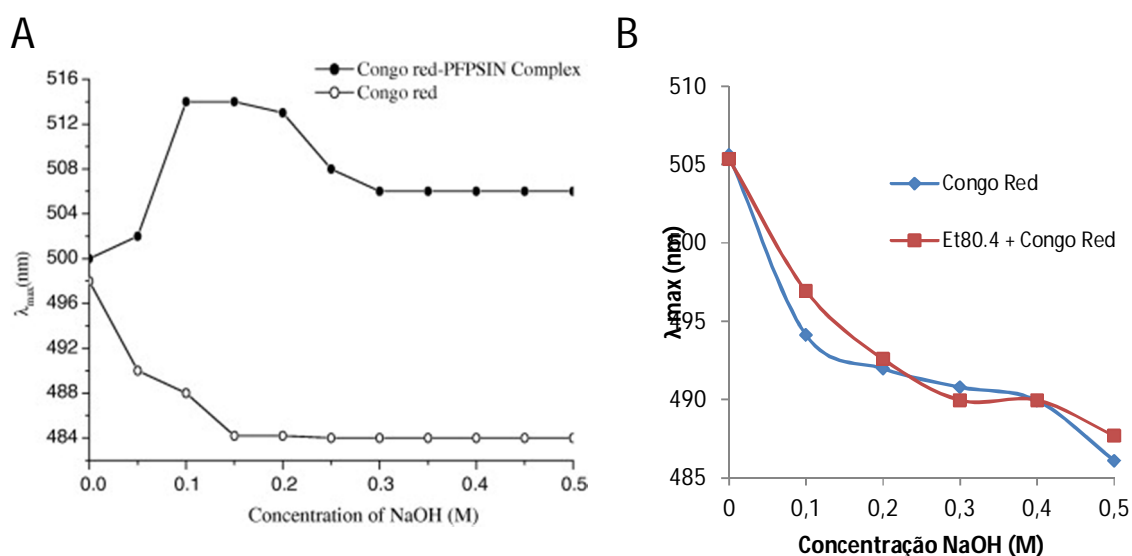


Figura 11 - Valores de absorvância máximos da solução de Congo Red e da solução de Congo Red com a amostra na presença de diferentes concentrações alcalinas.

Segundo o trabalho desenvolvido por Ogawa (84), deve verificar-se um desvio entre os máximos de absorvância da solução de Congo Red relativamente à solução com a estrutura em tripla hélice. Essa diferença deverá situar-se entre 493 e 523 nm (86). Ao aumentar a concentração de NaOH ocorre a destruição da estrutura em tripla hélice,



verificando-se uma descida da absorvância da solução. Uma vez que a solução de Et80.4 na presença de Congo Red tem um comportamento semelhante à da solução de Congo Red para as diferentes concentrações de NaOH, pode inferir-se que não existe a estrutura em tripla hélice na solução.

### 3.2.3 Hidrólise enzimática com celulase e $\alpha$ -amilase

De forma a avaliar a configuração anomérica da ligação (1 $\rightarrow$ 4) dos resíduos de glucose constituintes do extrato Et80.4, foi feita uma hidrólise com celulase e uma hidrólise com  $\alpha$ -amilase, numa tentativa de hidrolisar as ligações ( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4) e ( $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 4), respetivamente. Na Tabela 7 apresenta-se a análise das ligações glicosídicas antes e após as hidrólises enzimáticas.

Tabela 6 - Ligações glicosídicas presentes no extrato Et80.4 após tratamento com celulase e  $\alpha$ -amilase.

Ligações glicosídicas	Fração (% mol)		
	Et80.4	celulase	$\alpha$ -amilase
t-Man	4,6	10,2	3,7
2-Man	5,3	4,4	0,7
3 Man	-	2,0	1,2
2,3-Man	0,3	-	-
2,6-Man	3,4	8,2	18,7
<b>Total</b>	<b>13,6</b>	<b>24,8</b>	<b>24,3</b>
t-Glc	9,3	13,2	3,6
3-Glc	32,3	22,5	47,9
4-Glc	33,7	20,6	4,1
6-Glc	5,5	10,9	11,2
4,6-Glc	3,1	4,3	1,0
3,6-Glc	1,9	2,4	5,1
<b>Total</b>	<b>85,8</b>	<b>73,9</b>	<b>72,8</b>

A amilose e o papel foram usados como controlos durante as hidrólises com  $\alpha$ -amilase e celulase. A amilose foi o controlo positivo da ação da  $\alpha$ -amilase e o papel foi o controlo negativo. A função destes controlos inverteu-se ao estudar a ação da celulase, em que a amilose foi o controlo negativo e o papel foi o controlo positivo. Uma vez que os

valores apresentados se encontram em fração molar relativa, ao diminuir as ligações (1→4)-Glc, as restantes aumentam.

Não se verificou hidrólise da amilose pela celulase, o que confirma o controlo negativo. O rendimento da hidrólise do papel foi de apenas 26% nas condições utilizadas, mostrando que a reação não foi completa, possivelmente por inibição pelo produto. Na amostra, verificou-se uma diminuição de 39% de massa após a hidrólise com celulase. A diminuição da percentagem de ligações (1→4)-Glc na amostra hidrolisada pela celulase mostra a presença de ligações (β1→4)-Glc.

Não se verificou hidrólise pela α-amilase do controlo negativo. A hidrólise da amilose com a α-amilase apresentou um rendimento de 45%, mostrando que a reação, tal como se tinha verificado para o controlo positivo da celulase, não foi completa. A hidrólise da amostra na presença da α-amilase resultou em apenas 4% de ligações (1→4)-Glc, tendo ocorrido uma perda de 44% de massa. A diminuição da percentagem de ligações (1→4)-Glc na amostra hidrolisada pela α-amilase mostra a presença de ligações (α1→4)-Glc.

Só recentemente foi descrita a presença de polímeros semelhantes à celulose na parede celular da *Saccharomyces*. No entanto, ainda é incerto o seu papel como constituinte da parede celular (87). Pela observação da tabela 7 é de realçar que após o tratamento enzimático com a celulase observou-se um decréscimo similar tanto das ligações (1→4) como (1→3)-Glc, o que poderá indicar a presença no mesmo polissacarídeo de ligações (1→3) e (β1→4) que, após tratamento com celulase, podem ter difundido pela membrana de diálise. É possível existir uma cadeia de β-glucanas com ligações mistas de (β1→4)-Glc e (1→3)-Glc similar à liquenana, que é um polímero linear que apresenta 33% de ligações de glucose em (β1→3) e 66% em (β1→4) (62).

Através das reações de hidrólise foi possível caracterizar 73% das ligações (1→4)-Glc permanecendo ainda 27% de ligações em conformação desconhecida podendo ser tanto α como β.

### **3.2.4 Cromatografia de Permeação em Gel (SEC)**

Através de uma análise por SEC é possível inferir o tamanho dos polímeros constituintes da amostra. Na figura 12 estão representados os cromatogramas obtidos para as 4 frações obtidas na extração por MW. Na tabela 8 encontram-se os tamanhos das diferentes frações identificadas.

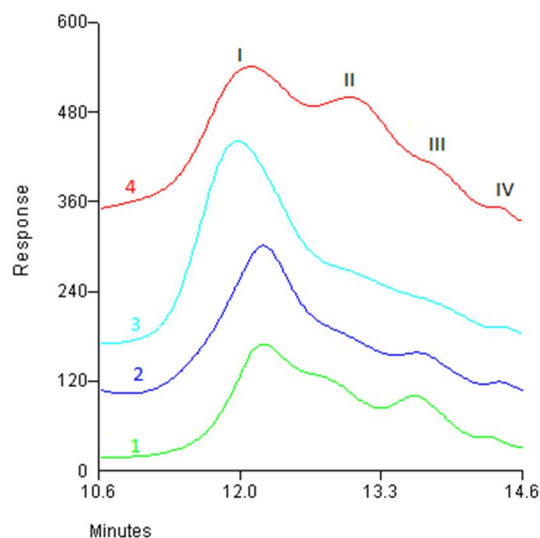


Figura 12 - Cromatogramas obtidos durante a análise dos extratos resultantes da extração em MW. O cromatograma identificado como 1 corresponde ao extrato Et80.1, o 2 ao Et80.2, o 3 ao Et80.3 e o 4 ao Et80.4. Os picos identificados I, II, III e IV correspondem às frações identificadas.

Todos os extratos têm os seus polissacarídeos distribuídos em quatro frações de diferentes pesos moleculares. Os perfis correspondentes aos extratos de manoproteínas, Et80.1 e Et80.2 são similares sendo possível a identificação de 4 frações. O perfil cromatográfico do Et80.4 apresenta quatro picos bem definidos enquanto o Et80.3 apresenta um grande pico na primeira população estando as outras 3 populações distribuídas na cauda deste pico de uma forma pouco acentuada.

Tabela 7 - Peso molecular médio das diferentes frações identificadas em cada extrato.

Fração	Et80.1 (kDa)	Et80.2 (kDa)	Et80.3 (kDa)	Et80.4 (kDa)
I	60	60	108	85
II	19	15	12	12
III	2	2	2	2
IV	0,3	0,3	0,3	0,3

A fração I dos extratos ricos em manose (Et80.1 e Et80.2) têm polímeros cujo peso molecular máximo é de 60 kDa. A fração I dos extratos ricos em glucose (Et80.3 e Et80.4) possuem polímeros com peso molecular mais elevado, apresentando a do terceiro ciclo um valor de 108 kDa e a do quarto ciclo um valor de 85 kDa. O peso molecular da segunda fração varia entre 12 e 19 kDa. O extrato Et80.1 possui a fração II com 19 kDa enquanto a do Et80.2 é de 15 kDa. As frações II dos extratos Et80.3 e Et80.4 têm o mesmo peso

molecular, de 12 kDa. Todos os extratos possuem a fração III com o mesmo peso molecular, de 2 kDa. As populações mais pequenas, com aproximadamente 300 Da, corresponderão a dímeros de manose ou glucose. Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos com métodos de extração severos, que levam à despolimerização de polissacarídeos.

O peso molecular mais elevado das frações ricas em manoproteínas obtido neste trabalho (Et80.1 e Et80.2) enquadra-se no grupo das manoproteínas extraídas sob condições severas no trabalho descrito previamente, levando a supor que a extração de polissacarídeos por MW levou a uma maior degradação dos açúcares. Segundo Kath e Kulicke (88), a extração de manoproteínas da parede celular da levedura *S. cerevisiae* recorrendo a métodos de extração químicos resultaram numa maior degradação das manoproteínas do que os métodos enzimáticos, tendo-se obtido moléculas com peso molecular compreendido entre 22 e 62 kDa, ao invés do peso molecular compreendido entre 64 e 112 kDa obtido com extrações enzimáticas. Noutro estudo realizado à *S. uvarum*, a extração de manoproteínas resultou em polímeros com 58-64 kDa recorrendo a hidrólise enzimática seguida de extração com água quente (89).

A análise das ligações glicosídicas mostrou que o extrato Et80.3 era constituído na sua maioria por glicogénio. O seu peso molecular também é bastante variável podendo assumir estruturas de elevado peso molecular. Provavelmente a fração I do extrato Et80.3, que é o pico predominante, corresponderá ao glicogénio presente. O extrato Et80.4 possui cerca de 32% de ligações (1→3) e 33% de ligações (1→4). No perfil cromatográfico apresentado é clara a presença de quatro frações, sendo a de maior peso molecular de 85 kDa. Segundo a literatura, a conformação em tripla hélice das (β1→3) glucanas verifica-se em polímeros com peso molecular acima dos 90 kDa (3). Esta informação vai de encontro aos resultados obtidos pela método do Congo Red que mostraram a ausência da estrutura em tripla hélice.

A massa molecular do extrato Et80.4, maioritariamente constituído por (1→3)-Glc e (1→4)-Glc, está de acordo com o peso molecular das glucanas com estas ligações, que variam entre 24 e 240 kDa. (31). No extrato Et80.4 também se encontram (β1→6)-glucanas. Este tipo de estrutura, segundo a literatura, pode possuir um peso molecular médio de 38 kDa (27). Como o peso molecular destas estruturas é mais baixo do que as (β1→3)-glucanas, é possível que correspondam à população de peso molecular de 22 kDa.

Após os resultados obtidos por SEC analítico, que mostraram que os extratos eram constituídos por quatro frações de peso molecular entre 108 e 0,3 kDa, escolheu-se o gel Sephacryl S-200 e procedeu-se à separação das diferentes frações constituintes dos extratos Et80.1 e Et80.4 (Figuras 13 e 14, respetivamente), com o objetivo de se obter material suficiente para se proceder à sua análise de ligações glicosídicas e aos ensaios de imunoestimulação. Foram recolhidas 125 frações que, depois de analisada a presença de açúcares, passaram a constituir 3 frações baseado no perfil cromatográfico obtido. Atendendo ao perfil cromatográfico, as frações recolhidas foram agrupadas nos picos maioritariamente obtidos, como se identifica nas Figuras 13 e 14.

O perfil cromatográfico obtido é semelhante ao do SEC analítico, verificando-se um pico inicial com uma descida gradual. Uma vez que o princípio técnico entre os dois métodos é o mesmo, espera-se que o comportamento da amostra seja semelhante. No entanto, na cromatografia preparativa não se obtiveram cromatogramas com picos bem definidos como os obtidos do SEC analítico. Pela análise dos cromatogramas verifica-se que todo o material da fração Et80.1 entrou na coluna, não existindo material com peso molecular superior ao volume de exclusão. Para além das manoproteínas, este extrato também contém 14% de glicogénio que, devido ao seu maior peso molecular, poderá estar eluído com esta fração. A primeira fração recolhida corresponderá aos compostos de maior peso molecular, de 60 kDa. Por outro lado, o extrato Et80.4 apresenta uma fração de maior peso molecular no volume de exclusão, correspondente à fração I de 85 kDa.

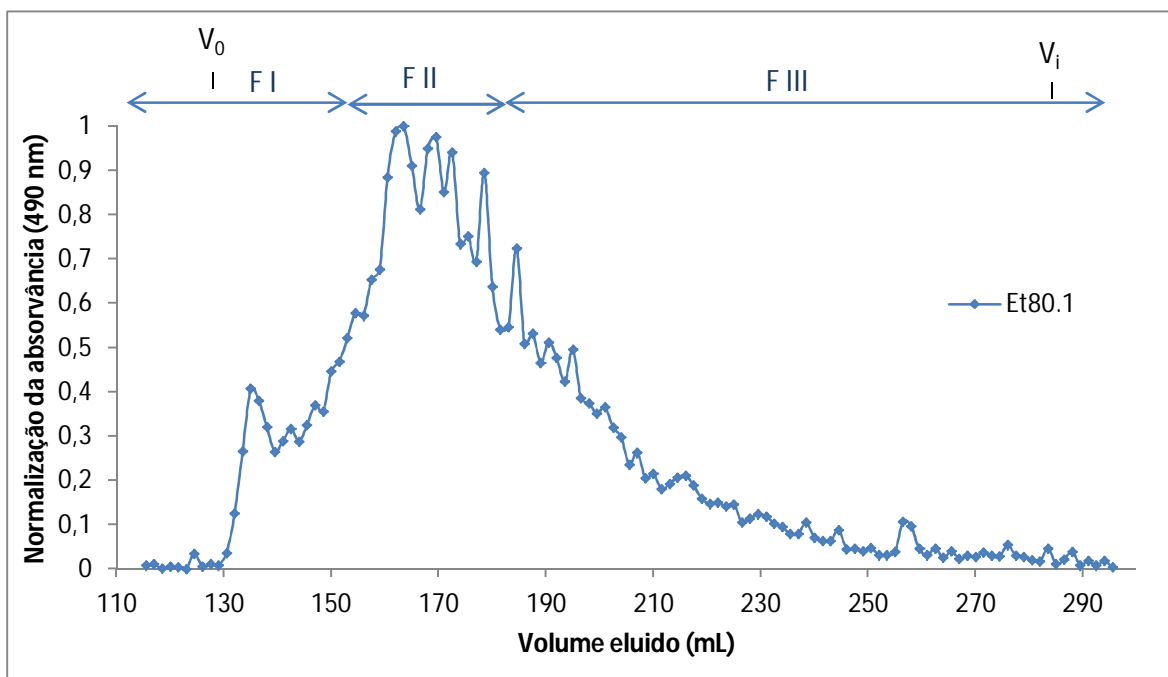


Figura 13 - Cromatograma referente ao extrato Et80.1.  $V_0$  e  $V_i$  correspondem ao volume de exclusão e inclusão, respectivamente.

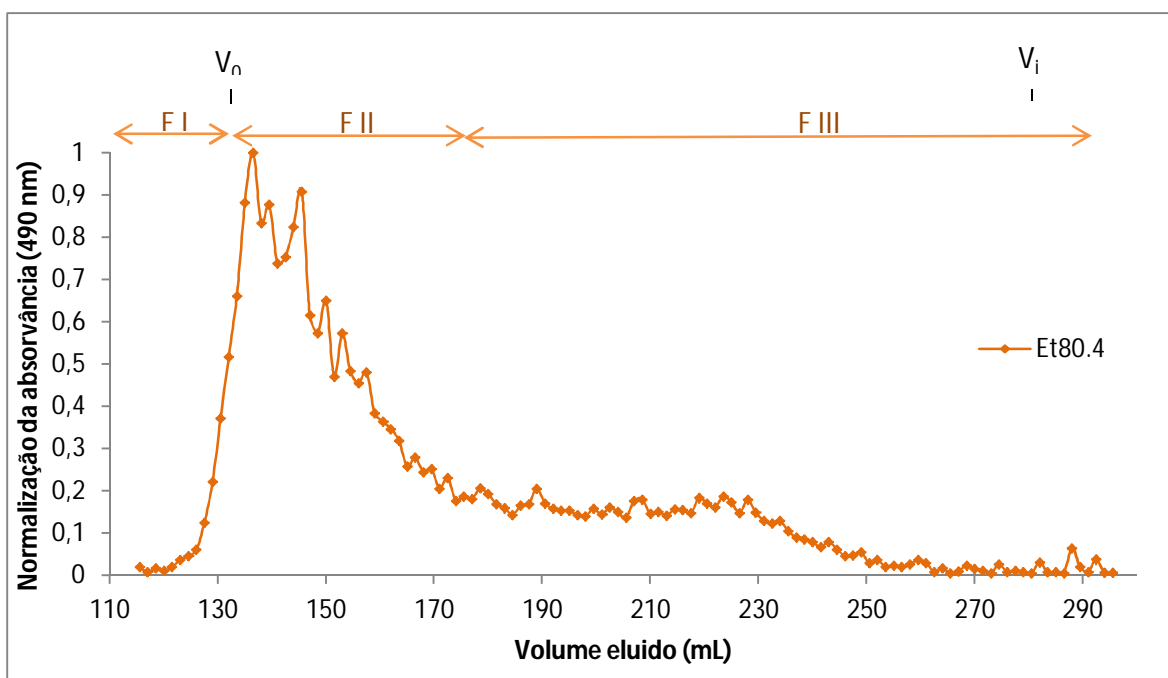


Figura 14 - Cromatograma referente ao extrato Et80.1.  $V_0$  e  $V_i$  correspondem ao volume de exclusão e inclusão, respectivamente.

### 3.2.4.1 Análise das ligações glicosídicas das frações do Et80.4

As frações obtidas a partir do fracionamento do extrato Et80.4 por cromatografia de exclusão molecular preparativa foram analisadas quanto às ligações glicosídicas. Na Tabela 10 encontram-se os resultados obtidos.

Tabela 8 - Ligações glicosídicas das frações recolhidas por cromatografia de exclusão molecular da fração Et80.4.

Ligação glicosídica	Fração (% mol)		
	F I	F II	F III
t-Man	0,8	1,9	7,3
2-Man	-	0,8	0,8
4-Man	0,2	-	-
2,3-Man	0,4	0,8	-
2,6-Man	0,6	3,2	8,4
<b>Total</b>	4,9	6,7	18,9
t-Glc	9,5	6,4	9,4
3-Glc	53,5	37,9	28,2
4-Glc	16,9	33,3	25,7
6-Glc	11,8	5,5	15,1
3,4-Glc	0,6	0,6	-
3,6-Glc	2,9	2,8	2,3
4,6-Glc	1,6	4,5	2,6
<b>Total</b>	93,8	90,9	81,1

Com a diminuição do peso molecular ocorre um decréscimo no teor de glucanas recolhidas, ao contrário dos resíduos de manose, cujo teor aumenta. A fração maior é maioritariamente composta por glucose, dos quais 54% se encontram em ligações (1→3). A presença de ligações (1→3,6) corresponde às ramificações das (β1→3)-glucanas com cadeias de (1→6)-Glc, estruturas essas que também estão presentes na parede celular das leveduras (31), sendo a razão entre 3-Glc/3,6-Glc igual a 18. Em menores quantidades, também estão presentes resíduos de glucose em ligação (1→4) que, em conjunto com a glucose em ligação (1→4,6), constitui o glicogénio, e glucose em ligação (1→6) que pode corresponder a glucanas (β1→6).

Na segunda fração, o teor de resíduos de glucose diminui cerca de 3%, aumentando o teor de resíduos de manose. Nesta fração, os açúcares em ligação (1→3)-Glc também diminuíram para 38%, tendo aumentado a percentagem da ligação (1→4)-Glc e (1→4,6)-Glc, característicos da presença de glicogénio. No entanto, esta estrutura é mais ramificada

do que a da primeira fração e a razão 4-Glc/4,6-Glc diminui de 11 para 7. A presença de ligações (1→3,6)-Glc indicam a existência de ramificações nos açúcares em ligação (1→3)-Glc, numa razão de 14, sendo mais ramificados que os recolhidos na fração anterior. As ligações (1→6)-Glc presentes na fração (6%) podem corresponder às cadeias que constituem as ramificações das (1→3)-Glc ou as (β1→6)-Glc. O resíduo de manose mais abundante estabelece ligações (1→2,6)-Man, indicando a presença de polímeros de manose muito ramificados, apresentando uma razão Manose total/2,6-Man de 2.

Na terceira fração, verificou-se um decréscimo de 10% de glucose em ligação (1→3) relativamente à segunda fração, continuando a ser o constituinte mais abundante (28%). Também estão presentes açúcares em ligação (1→3,6), que correspondem às ramificações das (1→3)-Glc. A razão 3-Glc/3,6-Glc é de 12, correspondendo a uma estrutura mais ramificada do que a da fração anterior. Cerca de 26% consiste em ligações (1→4)-Glc que, associadas às ligações (1→4,6)-Glc, constituem o glicogénio. Também se verificou um aumento de 10% de ligações (1→6)-Glc na terceira fração recolhida em detrimento das ligações (1→4)-Glc e das ligações (1→3)-Glc, confirmando que esta fração pode corresponder à fração de 22 kDa presente neste extrato. O teor de manose que constitui a terceira fração é superior ao das primeiras frações, tendo aumentado cerca de 13%. Nesta fração, os polímeros de manose, tal como a fração anterior, terão uma estrutura muito ramificada devido à predominância de ligações (1→2,6)-Man.

### 3.3 Determinação de proteína e aminoácidos

A proteína solúvel foi determinada pelo método BCA ao material polimérico (Et80) dos extratos obtidos nas extrações assistidas por MW. Verificou-se que existiam 167 µg/mg de proteína solúvel em ambos os extratos ricos em manose (Et80.1 e Et80.2). Esta proteína poderá estar associada aos resíduos de manose formando a manoproteína, um dos principais constituintes da parede celular das leveduras. Também no extrato Et80.3 se verificou a presença de 115 µg/mg de proteína solúvel. Este extrato ainda contém manoproteínas, apresentando um teor de 14% de resíduos de manose. O extrato Et80.4 não revelou conter proteína solúvel.

Complementarmente, foi avaliado o teor de aminoácidos constituintes das proteínas presentes no resíduo da autólise, nos extratos de Et80 e no resíduo final. Os resultados apresentam-se na Tabela 9.



Tabela 9 - Aminoácidos presentes no precipitado da autólise, nos extratos de MW e no resíduo final.

Aminoácido (µg/mg)	Amostras					
	resAut	Et80.1	Et80.2	Et80.3	Et80.4	ResFin
<b>Ala</b>	v	1	1	1	3	7
<b>Gly</b>	86	55	67	-	1	11
<b>Val</b>	32	18	12	7	5	35
<b>Thr</b>	8	6	12	2	1	7
<b>Ser</b>	13	11	21	4	2	10
<b>Leu</b>	27	11	13	4	4	38
<b>Ile</b>	18	9	6	1	2	22
<b>Pro</b>	58	-	44	-	-	59
<b>Asx</b>	20	9	18	2	2	18
<b>Glx</b>	20	10	22	3	3	20
<b>Lys</b>	18	4	18	-	v	17
<b>Total</b>	300	136	233	23	22	282

v - Quantidades vestigiais

A análise de aminoácidos mostra que o resíduo de autólise, o resíduo final e o extrato Et80.2 possuem maior teor de aminoácidos, apresentando 300, 282 e 233 µg/mg respectivamente. Tanto o extrato Et80.1 como o Et80.2 apresentaram valores similares entre a determinação do teor de aminoácidos e da proteína solúvel, tendo-se obtido um teor de aminoácidos total de 136 µg/mg e 233 µg/mg, respectivamente. Quanto ao Et80.3, foi determinado um teor proteico de 115 µg/mg, sendo o teor de aminoácidos de apenas 23 µg/mg. Provavelmente existem aminoácidos na amostra que não foram identificados e quantificados. Apesar do quarto extrato não ter apresentado proteína solúvel, a análise de aminoácidos revelou um teor de 38 µg/mg, possivelmente devido à maior sensibilidade do método cromatográfico em relação ao colorimétrico.

Pela análise de aminoácidos, a glicina, a valina, a leucina e a prolina são os aminoácidos mais abundantes. De acordo com a literatura verifica-se um maior conteúdo em aminoácidos essenciais tais como a valina, leucina, lisina e arginina na *S. cerevisiae*, que poderão constituir as manoproteínas (90). Enquanto a valina e a leucina se caracterizam pela sua hidrofobicidade, as cadeias polares da lisina e da arginina conferem solubilidade à molécula (91). O extrato Et80.1 tem como aminoácidos majoritários a glicina e a valina, que conferem características hidrofóbicas à amostra. Verifica-se que a serina e a treonina são mais abundantes que a asparagina (aqui determinada como Asx,

somatório de Asn e de Asp, uma vez que esta técnica de quantificação de aminoácidos não permite a distinção entre aspartato e asparagina e entre glutamato e glutamina). O perfil de aminoácidos identificados para o extrato Et80.2 é similar ao Et80.1, predominando os aminoácidos hidrofóbicos. O extrato Et80.3, constituído maioritariamente por glucanas, é pobre em aminoácidos, sendo a valina o aminoácido maioritário. Relativamente ao extrato Et80.4, foi possível quantificar aminoácidos, mas não proteína solúvel. Neste extrato a valina é o composto maioritário, constituindo 23% do conteúdo de aminoácidos.

Entre o resíduo de autólise e o resíduo final verifica-se uma alteração de perfil entre o teor dos aminoácidos, nomeadamente o teor de glicina que baixou no resíduo final tendo aumentado o teor de leucina e isoleucina. O facto dos extratos Et80 terem sido enriquecidos em glicina, faz com que o resíduo final fique empobrecido nestes aminoácidos face ao resíduo da autólise.

Por análise elementar foi determinado o teor do elemento de Nitrogénio nas amostras insolúveis, ou seja, no resíduo da autólise e no resíduo final. No resíduo, o teor de nitrogénio corresponde a uma concentração de proteína de 512,8 mg/g e no resíduo final de 545,7 mg/g. No entanto, deve ter-se em atenção que os valores obtidos poderão estar sobreestimados devido à presença de bases azotadas provenientes dos ácidos nucleicos. Uma vez que se verificou a presença de desoxirribose no resíduo final foi feita uma hidrólise com a enzima Ribonuclease A com vista à eliminação dos ácidos nucleicos. Por análise de açúcares confirmou-se que esta enzima eliminou a presença de desoxirribose e ribose nas amostras. Após a hidrólise verificou-se uma perda de 11% de massa de amostra que corresponderia a material nucleico presente no resíduo final.

### **3.4 Ensaios de imunoestimulação**

As células utilizadas para a realização deste estudo foram recolhidas do baço de um murganho. O baço desempenha uma papel fundamental na manutenção dos eritrócitos removendo de circulação os que se encontram anormais ou senescentes. Tem também a importante função imunológica de maturação, diferenciação e residência de linfócitos (92).

Os extratos obtidos durante a extração sequencial em MW foram submetidos à avaliação do seu potencial imunoestimulador. A uma concentração de 75 µg/mL de polissacarídeos em cada poço verificou-se que apenas o extrato Et80.1 foi capaz de estimular os linfócitos B em apenas 20%, tendo-se verificado uma elevada morte celular. Perante estes resultados foram feitos novos ensaios com o extrato Et80.1 recorrendo a

concentrações mais baixas, de 25 µg/mL e 50 µg/mL (Figura 15). Nestas condições, a ativação dos linfócitos aumentou de 62 para 69%, de 25 µg/mL para 50 µg/mL respetivamente. Os polissacarídeos que compõem este extrato são maioritariamente manoproteínas (76%) reconhecidas pelos recetores TLR4. No entanto também estão presentes ácidos nucleicos em baixa concentração (< 6%) que também estão descritos como ativadores dos recetores TLR, nomeadamente o TLR3, 7 e 9 (93). Paralelamente, também se estudaram as frações FI, FII e FIII obtidas do fracionamento da Et80.1 numa concentração de 50 µg/mL. Em todos os casos se verificou a ativação de linfócitos B em 92, 89 e 96%. No entanto, a fração FI e FII não são estatisticamente diferentes entre si enquanto a fração FIII não é estatisticamente diferente ao valor de ativação celular atingido pelo LPS. Nenhuma destas amostras foi descontaminada de forma a eliminar uma possível contaminação por LPSs.

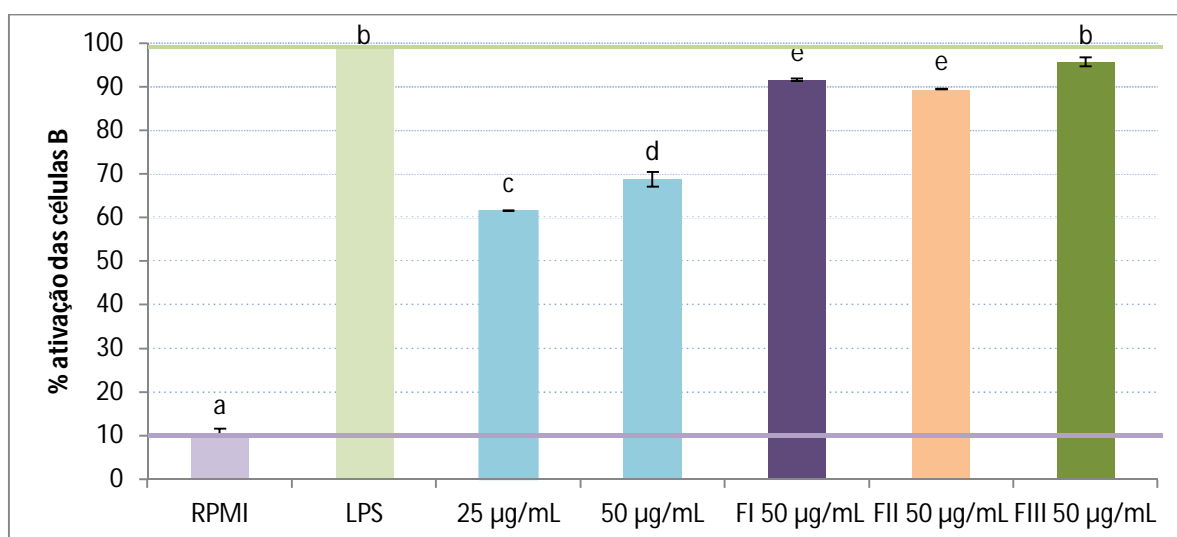


Figura 15 - Percentagem de ativação das células B perante o estímulo do extrato Et80.1 a 50 e 25 µg/mL e das respetivas frações da coluna de exclusão molecular comparada com o controlo negativo (RPMI) e positivo (LPS). As legendas das colunas com diferentes letras indicam que são estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Uma vez que a concentrações mais baixas se verificou ativação linfocitária, foi feito o estudo das amostras numa gama de concentração, desde 12,5 a 75 µg/mL, de modo a avaliar qual a relação da concentração com a atividade. Foram novamente estudadas as amostras Et80.1 e as respetivas frações FI, FII e FIII recolhidas aquando da separação em coluna.

Na Figura 16 encontram-se os citogramas dos controles, RPMI e LPS. Os quadrantes superiores dizem respeito às células que foram identificadas como ativadas, sendo os quadrantes inferiores correspondentes às células não ativadas. Os quadrantes à direita correspondem às células B enquanto os quadrantes à esquerda correspondem às células não B. Assim, as células B ativadas encontram-se no quadrante C2. O cálculo da percentagem de ativação de células B é feito através da razão entre as células B ativadas (quadrante C2) e o total de células B (quadrantes C2 e C4), tendo-se obtido 16,2% de ativação das células B com o meio RPMI e 77,6% com o LPS.

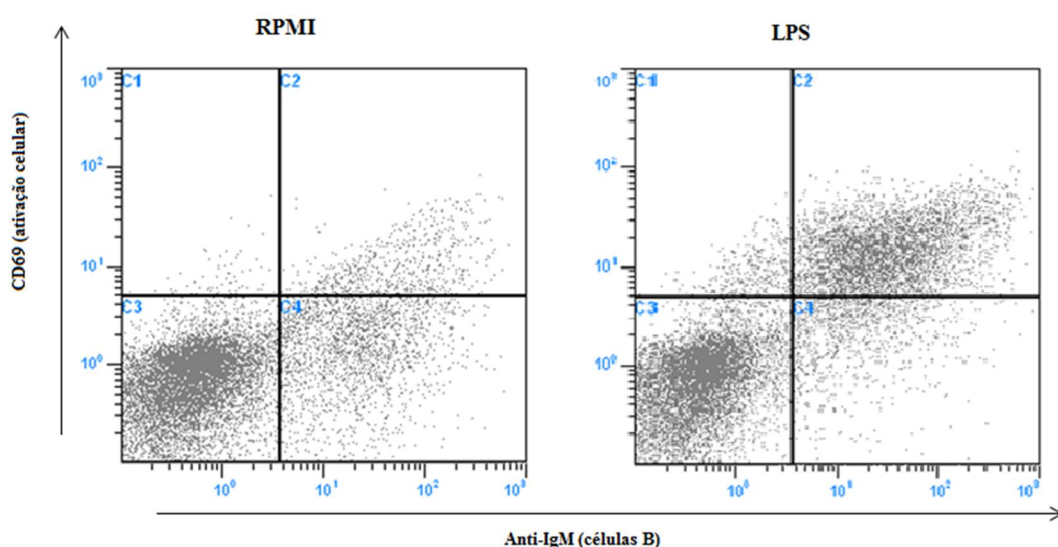


Figura 16 - Citogramas correspondentes aos controlos negativo, RPMI, e positivo, LPS, de ativação de células B. Em abcissa distinguem-se as células B das não B e em ordenada distinguem-se as células ativadas das não ativadas.

Na Figura 17 estão representadas as percentagens de ativação de células B das amostras em estudo. Neste estudo verificou-se que a amostra Et80.1 deixou de demonstrar atividade imunoestimuladora a 25 e 50  $\mu\text{g/mL}$  e a percentagem de ativação das células B pelos extratos obtidos por cromatografia em coluna foi menor que nos ensaios anteriores.